

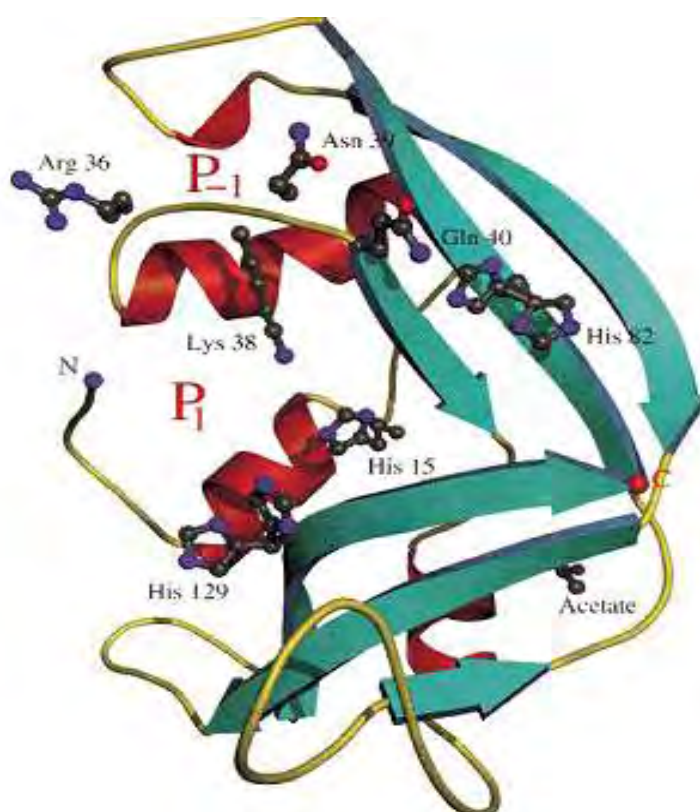


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΗΣ 5'-ΦΘΟΡΟ-ΟΥΡΙΔΙΝΗΣ ΣΤΗ
ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗ ΤΩΝ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ (EDN): ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ- ΠΡΟΚΟΒΑ ΕΛΕΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ-2013

«Η σύνδεση της 5'-φθορο-ουριδίνης στη νευροτοξίνη των ηωσινόφιλων
κυττάρων (EDN)- Κινητικές μελέτες»

«The binding of 5'-fluoro-uridine to eosinophil derived neurotoxin.
Kinetic studies»

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Επιτροπή:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαρία Κοντού, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα (Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας) για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η βοήθεια και οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες για την διεκπεραίωση της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και φίλη Παρούλα Κυλινδρή, για την άψογη συνεργασία και ηθική υποστήριξη για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Τέλος, ευχαριστώ τη Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου (διδακτορική φοιτήτρια) και την Αναστασία Καντσάδη (διδακτορική φοιτήτρια) για την πολύτιμη καθοδήγηση και υπομονή τους καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία και τη δημιουργία ενός φιλικού κλίματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη-Γενικά	9
1.2 Η δομή της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης EDN.....	14
1.3 Το ενεργό κέντρο της EDN-Καταλυτικός μηχανισμός.....	17
1.4 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος	20
1.5 Ενζυμική Αναστολή.....	23
1.6 Νουκλεοζίτες	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
1 ^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ (EDN)	35
1.Πλασμιδιακοί φορείς και επαγωγή της έκφρασης της EDN.....	35
2.Συλλογή και λύση των κυττάρων.....	40
3. Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση	43
4. Εγκλεισμός της πρωτεΐνης (incubation)	44
5. Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης	45
6. Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)	47
7.Συμπύκνωση πρωτεΐνης	48
8.Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN	49
9. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE.....	51
10. Εισαγωγή κρυσταλλώσεων	56

2 ^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ	59
1.Προσδιορισμός ειδικής δραστικότητας της EDN	60
2.Υπολογισμός συγκέντρωσης της EDN.....	60
3.Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	61
4. Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα.....	63
5.Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό k_m και IC_{50}	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
1.Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN.....	70
2.Κρυστάλλωση.....	72
3.Κινητικά πειράματα	73
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

ABSTRACT

Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) is one of the four major proteins found in the cytoplasmic granules of human eosinophil leukocytes. It is characterized by the neurotoxic effect of the Gordon phenomenon in rabbits. EDN is released under allergic and parasitic conditions, and it has been found to be involved in asthma and inflammatory disorders, as it exists in high concentrations in the urine of the patients. EDN is also implicated in neurological abnormalities in patients suffering from so-called "hyper-eosinophilic syndrome".

EDN belongs to the superfamily of ribonuclease A (RNase A) and shows significant structural and enzymatic similarities with RNase A. All the biological actions of EDN are totally dependent on its ribonucleolytic activity and therefore research efforts focus on the discovery of suitable inhibitors that will modulate its enzymatic activity and might have therapeutic potential. Structural similarities between EDN and RNase A, especially on the active site facilitate the design of appropriate inhibitors of EDN based on RNase A inhibitors.

In the present work, after isolation and purification of EDN, the inhibitory capacity of the synthetic nucleoside 5-fluoro-uridine (6e) was studied. Kinetic studies for the determination of the IC₅₀ value showed that 6e decrease EDN's ribonucleolytic activity quite effectively with IC₅₀ = 33.07 ± 0.5 µM. Our results indicate that specific inhibitors of eosinophil neurotoxin can be found by the modification of RNase A inhibitors.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) είναι μια από τις τέσσερις κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται για τη νευροτοξική της δράση και το φαινόμενο *Gordon* που προκαλεί στα κουνέλια. Η EDN εμφανίζει αντιική, αντιπαρασιτική και αντιελμινθική δράση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο άσθμα και σε φλεγμονές, καθώς βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ούρα ασθενών. Η EDN, εμπλέκεται επίσης σε ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς που πάσχουν από το λεγόμενο «Υπερ-ηωσινοφιλικό σύνδρομο». Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNase A) και παρουσιάζει σημαντικές δομικές και ενζυμικές ομοιότητες με την RNase A. Η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα σχετίζεται άμεσα με τις παθολογικές της δράσεις και έτσι οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ανακάλυψη κατάλληλων αναστολέων της ενζυμικής της δραστηριότητας οι οποίοι θα μπορούν να έχουν φαρμακευτική δράση στις παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την EDN. Οι δομικές ομοιότητες EDN με την RNase A, διευκολύνουν το σχεδιασμό αναστολέων με τη χρήση ενώσεων που παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση (της τάξεως των μM), στην RNase A.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αφού διεξήχθη απομόνωση και καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, μελετήθηκε κινητικά η πρόσδεση του συνθετικού νουκλεοζίτη, 5-φθορο-ουριδίνη (6e) στην EDN. Πράγματι μετά από κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} βρέθηκε ότι ο 6e αναστέλλει ικανοποιητικά την EDN με τιμή $IC_{50}=33.07 \pm 0.5 \mu\text{M}$. Έτσι, λοιπόν επιδεικνύεται πως αναστολείς της RNase A έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν και την EDN και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίώματα για το σχεδιασμό νέων ισχυρών αναστολέων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με φαρμακευτικό ενδιαφέρον για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών που σχετίζονται με υπερηωσινοφιλικά σύνδρομα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη-Γενικά

Το ηωσινόφιλο κύτταρο, αν και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Wharton Jones το 1846, έγινε γνωστό και πήρε το όνομά του από τον Paul Erlich το 1879, λόγω της ιδιότητας των κοκκίων του να βάφονται με τη χρωστική ηωσίνη. Το ώριμο ανθρώπινο ηωσινόφιλο είναι ελαφρά μεγαλύτερο από το ουδετερόφιλο με διάμετρο 10-17μ, έχει δίλοβο πυρήνα και περιέχει τρεις τύπους εκκριτικών κοκκίων, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής του στο μυελό των οστών και συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη: (α) τα ειδικά ή δευτερογενή κοκκία που παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την ηωσίνη και περιέχουν τις παρακάτω κυτταροτοξικές ουσίες: μείζονα βασική πρωτεΐνη (MBP), ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP), ηωσινόφιλη υπεροξειδάση (EPO), ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) και β-γλυκουρονιδάση· (β) τα μικρά κοκκία που περιέχουν κυρίως υδρολυτικά ένζυμα, όπως όξινη φωσφατάση κι αρυλσουλφατάση, ενώ μπορεί να περιέχουν και καταλάσες, και (γ) τα πρωτογενή κοκκία τα οποία είναι στρογγυλά, ομοιογενούς πυκνότητας, παρατηρούνται χαρακτηριστικά στα ηωσινόφιλα προμυελοκύτταρα και μυελοκύτταρα και περιέχουν την κρυσταλλική πρωτεΐνη Charcot-Leyden. (Hamann *et al.*, 1991). Τα ηωσινόφιλα περιέχουν επίσης σωματίδια κι οργανύλια πλούσια σε λιπίδια (όπως το αραχιδονικό οξύ), που δε συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και αυξάνονται σε αριθμό κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Η δράση των σωματιδίων αυτών δεν είναι πλήρως

διευκρινισμένη.

Τα ηωσινόφιλα κύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα και μεταναστεύουν στο αίμα μέσω της IL-5. Η IL-5 αποτελεί τη σημαντικότερη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ηωσινόφιλων, κατευθύνοντας επιλεκτικά τη διαφοροποίηση των προγονικών ηωσινόφιλων-βασεόφιλων κυττάρων προς την ηωσινοφιλική σειρά.

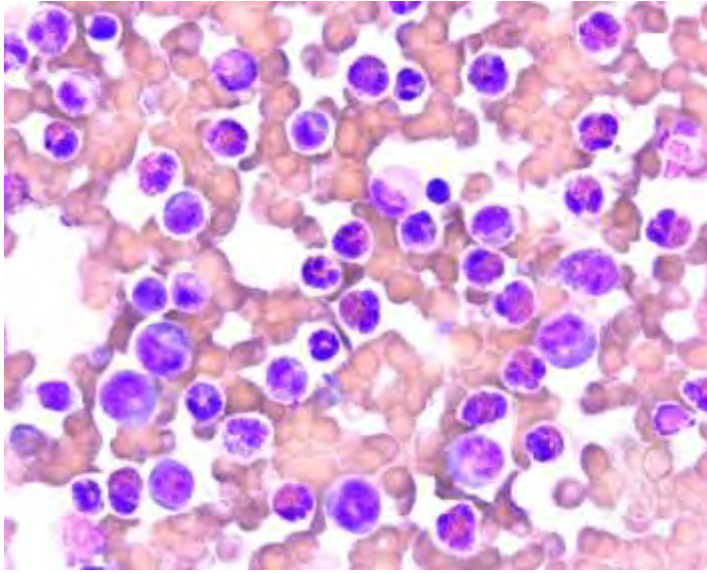
Αρχικά λοιπόν, τα ηωσινόφιλα κατανέμονται στο θύμο αδένα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στη μήτρα και στο μαστικό αδένα. Θεωρούνται αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα(APC) και παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων .

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) ή αλλιώς RNase 2, είναι μια μικρή, κατιονική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A. Είναι γνωστή για την πρόκληση του φαινομένου του Gordon στα κουνέλια, όπου με τη νευροτοξική της δράση καταστρέφει τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας. Έτσι , στο αρχικό στάδιο παρατηρείται μυϊκή δυσκαμψία, η οποία ακολουθείται από αταξία που οδηγεί τελικά σε σοβαρή παράλυση.(*Durack et al., 1978, 1981, Gleich, G. J., et al., 1986*). Στον άνθρωπο δεν έχει παρατηρηθεί τέτοια επίδραση .Εκτός από νευροτοξικότητα, παρουσιάζει ήπια κυτταροτοξικότητα ενάντια στους έλμινθες, χαρακτηριστικό κυρίως της ηωσινόφιλης κατιονικής πρωτεΐνης και της ηωσινόφιλης υπεροξειδάσης. Η αμυντική της δράση της έναντι ξενιστών δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα .

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση παθολογικών φαινομένων στο βρογχικό αλλεργικό άσθμα, όπως προώθηση της φλεγμονής και βρογχική υπερευαισθησία. Αυτό αποδεικνύεται και με τις υψηλές τις συγκεντρώσεις στα ούρα ασθενών με άσθμα (*Sedgwick et al 2004*). Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, χάρη στην ριβονουκλεολυτική της δράση, παρουσιάζει σημαντική αντιϊκή δράση εναντίων ιών με μονόκλωνο RNA. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τη δράση του ιού RSV (respiratory syncytial virus) που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα, καθώς ανάλογα με τη συγκέντρωση της ελαττώνει τη μολυσματικότητα του. (*Rosenberg et al. 2001*). Παρόλα αυτά όμως καμία από τις υπόλοιπες περισσότερο δραστικές ριβονουκλεάσες (RNaseA, onconase, RNaseK6) δεν παρουσιάζει αντιϊκή δράση. Το "ιδιαίτερο" χαρακτηριστικό της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, είναι 9 κατάλοιπα στο βρόχο L7 του καρβοξυτελικού της άκρου, κάτι που δε διαθέτουν οι υπόλοιπες ριβονουκλεάσες. Ο βρόχος L7 αλληλεπιδρά με τα virion και διευκολύνει την πρόσβαση της πρωτεΐνης στο ιϊκό γονιδίωμα. (*Sicriwal et al, 2012*).

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μερικώς υπεύθυνη για κάποιες ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς με το <<Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο>> (**Εικόνα 1**) (*Chusid, M. J., et al., 1975*).

Ακόμα, εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι το φαινόμενο της υπερηωσινοφιλίας σχετίζεται και με άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο της ηωσινοφιλικής μυαλγίας, που συνδέεται με την κατανάλωση της L-τρυπτοφάνης, (*Hertzman, P. A., et al., 1990, Silver, R. M., et al., 1990*), με άτομα που εμφανίζουν νευρίτιδα (*Bulpitt, K. J. et al., 1990*), (*Roubenoff, R., et al., 1990*), (*Martin, R. W. et al., 1990*) αλλά και με άτομα που εμφανίζουν πλήθος διαφόρων νευρολογικών επιπλοκών (*Ng, S.C., et al., 1989, Tolander, L. M. et al., 1991, Kaufman, L. D., et al., 1991*).



Εικόνα 1: Ιδιοπαθές υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο

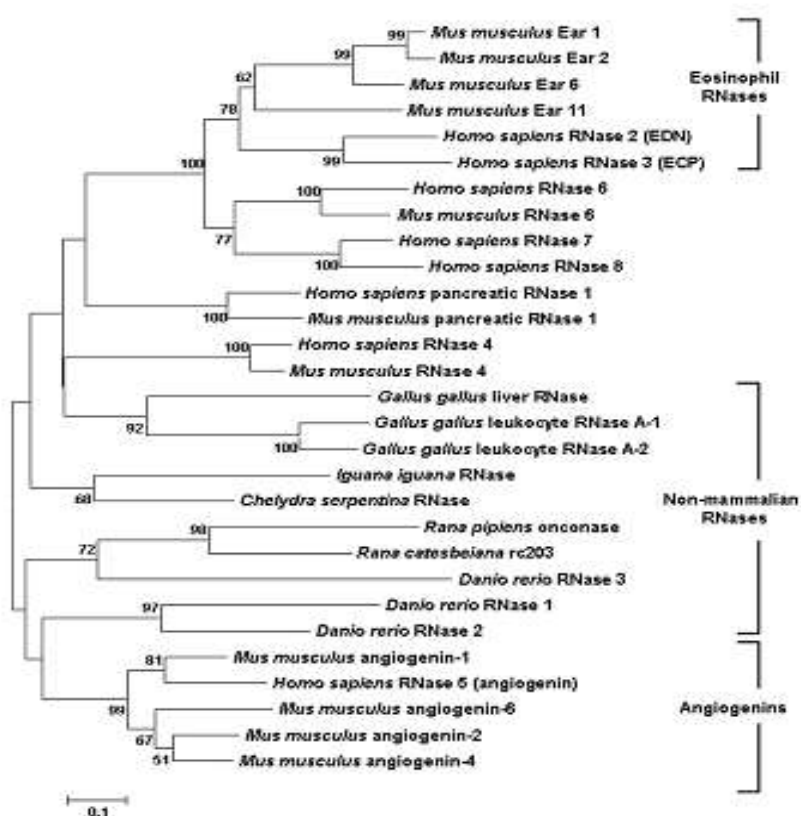
Το 1980 απομονώθηκαν πολλές φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α πρωτεΐνες από άλλους ιστούς. Τα γονίδια τους κλωνοποιήθηκαν, αλληλουχήθηκαν και παρατηρήθηκε τελικά ότι παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α.

Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α και παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιοχημικές, δομικές και εξελικτικές μελέτες καθώς είναι ανήκουν στις πιο καλά χαρακτηρισμένες οικογένειες σε επίπεδο σπονδυλωτών.

Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και η αγγειογενίνη (RNase 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP, RNase 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN, RNase 2) και μερικές άλλες ακόμα κυτταροτοξίνες. (Rosenberg *et al*, 2008) Ένα φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει αυτές τις σχέσεις ομολογίας των πρωτεϊνών της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α παρατίθεται στην Εικόνα 2.

Ανάμεσα στα κοινά χαρακτηριστικά που περιέχουν οι δραστικές πρότεινες της υπερικογενείας της ριβονουκλεάσης Α, είναι 6-8 κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ περιλαμβάνουν 2 ιστιδίνες στο καταλυτικό τους κέντρο. Επίσης, περιλαμβάνουν μια λυσίνη σε ένα σταθερό μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF).

Τέλος, κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπερικογένειας κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε ένα μονό εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 (*Rosenberg et al,2008*)



Εικόνα 2: Φυλογενετικό δέντρο της υπερικογένειας της ριβονουκλεάσης Α.

1.2 Η δομή της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης EDN

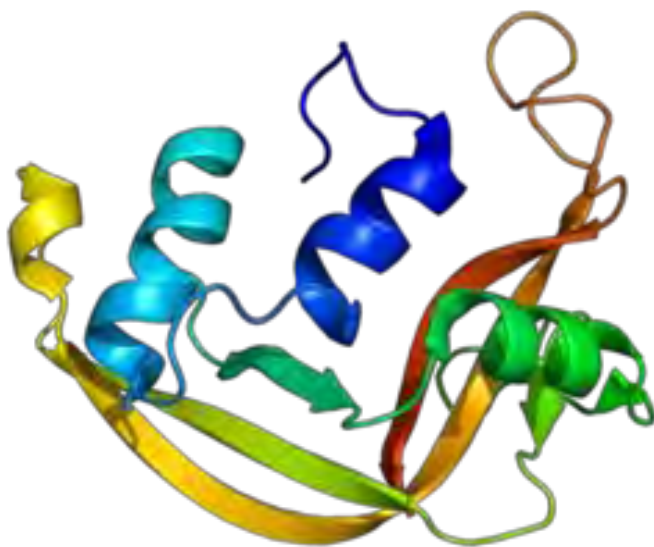
Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων. Κάθε πρωτεΐνη έχει μια μοναδική και απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων. Η αλληλουχία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης συχνά ονομάζεται πρωτοταγής δομή, και καθορίζει την τρισδιάστατη δομή της στο χώρο. Η γνώση της αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης, μας είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς δράσης και λειτουργίας της.

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια ριβονουκλεάση η οποία έχει όμοια δράση με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A. Καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων μορίων RNA υδρολύοντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων που αποτελούνται κυρίως από πυριμιδίνες. Η αλληλουχία των αμινοξέων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης παρουσιάζει 36% ομολογία με την αλληλουχία των αμινοξέων της RNase A και 67% ομολογία με την ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη ECP.

Ωστόσο, η δραστηριότητα της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης ανάλογα με το υπόστρωμα είναι 3-30 φορές χαμηλότερη από της ριβονουκλεάσης A. (Sorrentino *et al*, 1998). Πρόκειται για μια μικρή, γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 18,4 kDa (Durack *et al*, 1981). Είναι κατιονική, και το ισοηλεκτρικό της σημείο έχει την τιμή 8,9. Το c DNA της διαθέτει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο κωδικοποιεί για 34 αα. Στα αμινοξέα αυτά, περιλαμβάνονται 27 υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν το αμινοτελικό άκρο. Επίσης, η EDN σχηματίζει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ κυστεϊνών στις θέσεις 23 και 33, 37 και 96, 55 και 111 καθώς και 62 και 71. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αυτοί είναι αρκετοί για μια τόσο μικρή πρωτεΐνη, και μαρτυρούν τη σταθερότητά της. (Rosenberg *et al*, 1998).

Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών αναδιπλώνονται σε διάφορες δομές, και έτσι καθορίζεται η δευτεροταγής δομή του μορίου (**Εικόνα 3**). Η κρυσταλλική δομή της ανασυνδυασμένης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1996 σε ευκρίνεια 1.83 Å (*Mosimann S.C. et al, 1996*) και από τότε, η κρυσταλλική της δομή έχει προσδιοριστεί σε ευκρίνεια 0.9 Å (*Swaminathan G.J. et al., 2002*).

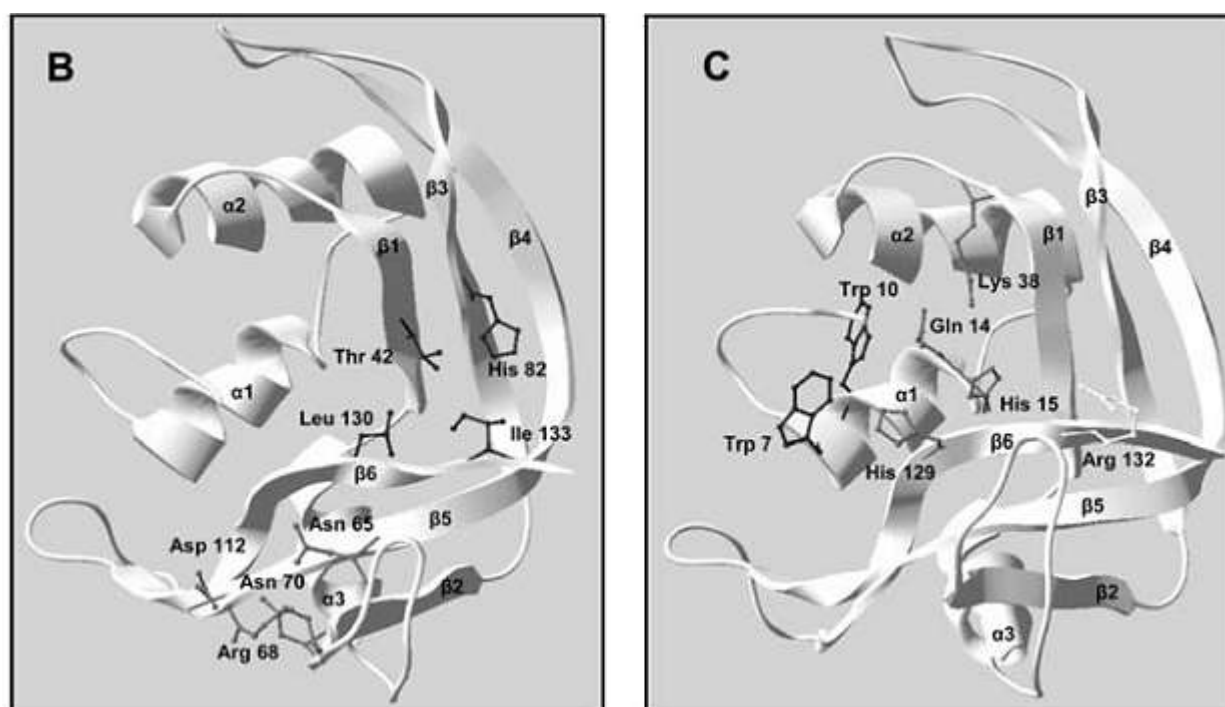
Αποτελείται λοιπόν από μια α-έλικα στο αμινοτελικό της άκρο, και δύο "λοβούς", που ο καθένας αποτελείται από 3 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και μία α-έλικα. Επίσης αποτελείται από 7 βρόχους L1-L7 οι οποίοι περιλαμβάνουν το 50% των καταλοίπων αμινοξέων. (*Mosimann et al., 1996*).(**Εικόνα 4**) Τα αμινοξέα που βρίσκονται στις α-έλικες και στα β-πτυχωτά φύλλα απεικονίζονται στον **Πίνακα 1**.



Εικόνα 3: Η δευτεροταγής δομή της ηωσινόφιλης-νευροτοξίνης

Πίνακας 1: Απεικόνιση των αμινοξέων που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης

α-έλικες	Β-πτυχωτά φύλλα
α ₁ (Thr ₆ -Ile ₁₆)	B ₁ (Asn ₃₉ -Leu ₄₅)
α ₂ (Gln ₂₂ -Arg ₃₅)	B ₂ (Asn ₇₀ -Ser ₇₄)
α ₃ (Thr ₄₇ -Cys ₅₅)	B ₃ (Val ₇₈ -Thr ₈₇)
	B ₄ (Arg ₉₇ -Asn ₁₀₄)
	B ₅ (Met ₁₀₇ -Arg ₁₁₄)
	B ₆ (Pro ₁₂₀ -Ile ₁₃₄)



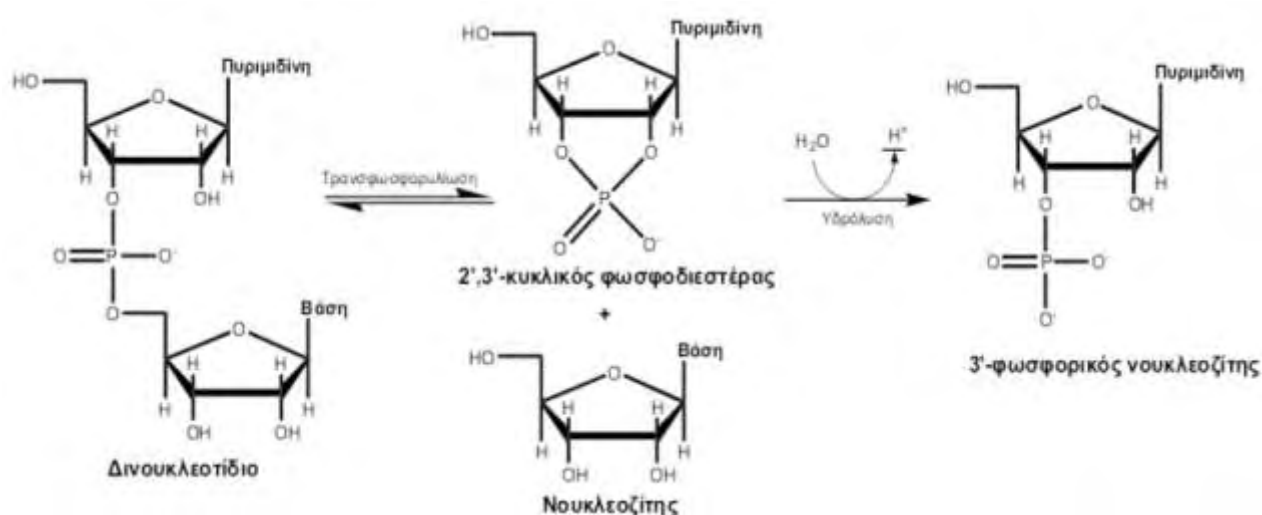
Εικόνα 4: Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της EDN. Στο Β παρατηρούμε τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα που περιλαμβάνονται στη B1 υποπεριοχή και με γκρι χρώμα στη B2 υποπεριοχή αντίστοιχα. Στο C τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα αποτελούν την P2 υποπεριοχή, με γκρι χρώμα την P1 και με λευκό την P0.

1.3 Το ενεργό κέντρο της EDN-Καταλυτικός μηχανισμός

Όπως προαναφέραμε, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια των ριβονουκλεασών και καταλύει τη διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών μορίων RNA. Η συγκεκριμένη αντίδραση κατάλυσης που θα περιγραφεί διεξοδικά παρακάτω, είναι η αντίδραση της RNase A και ισχύει και για την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη. Τα ομόλογα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της ριβονουκλεάσης A His12, Lys41 και His119, είναι στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη τα αμινοξέα His15, Lys38 και His129. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη. Οι δύο His, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες.

Η υδρόλυση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα (Εικόνα 5). Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικό-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα (Moussaoui et al,1998).

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση (Stryer *et al*, 2002). Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο.



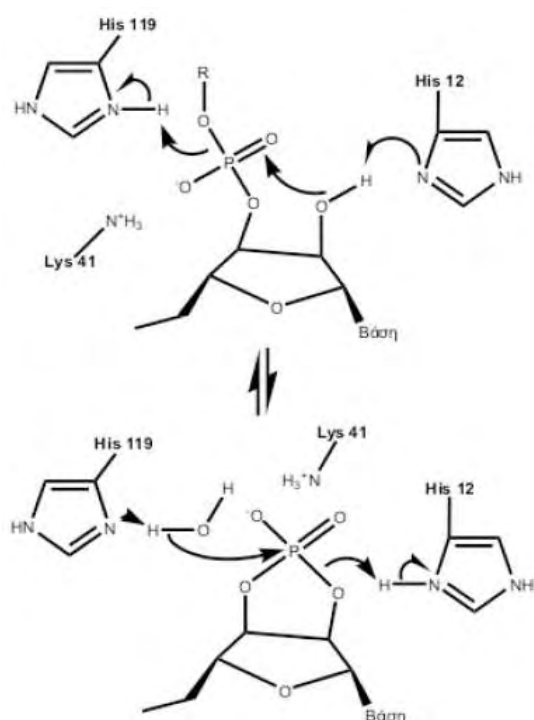
Εικόνα 5: Η αντίδραση κατάλυσης της ριβονουκλεάσης Α.

Τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys 41 (στην EDN τα ομόλογα είναι His15, Lys38 και His129) (Εικόνα 6). Η αντίδραση ξεκινά με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-Ο με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιονισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-ΟΗ, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του Ο. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιο της στο 5'-Ο, και το 2'-Ο σχηματίζει δεσμό με το Ρ, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από την θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ Ρ και του 5'-Ο διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο Ο. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του Ρ και του 2'-Ο παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-Ο που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-Ο βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας.

Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο O από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το $2'-O$ βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (*Stryer et al, 2002*).



Εικόνα 6: Ο μηχανισμός κατάλυσης στη ριβονουκλεάση A.

1.4 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και η ριβονουκλεάση A, παρουσιάζουν 36% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, καθώς και 46% ομοιότητα. Ο πυρήνας του καταλυτικού κέντρου και των δυο πρωτεϊνών αποτελείται από τις υποπεριοχές B1,P1,B2 (Εικόνα 4) οι οποίες είναι κοινές.

Παρόλα αυτά μεταξύ των δυο πρωτεϊνών παρατηρούνται κάποιες διαφορές στις περιφερικές υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος.(*Boix et al., 1999*).

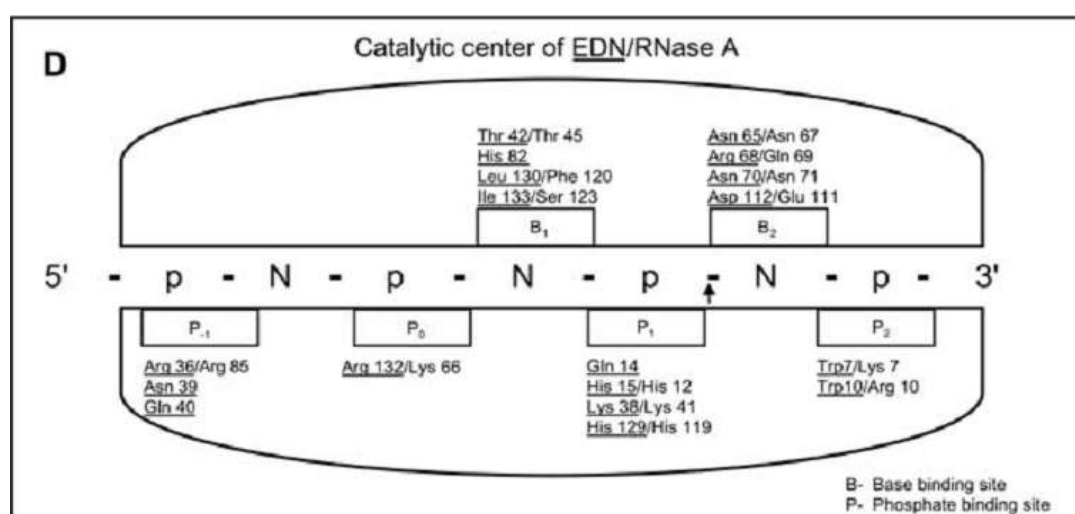
Ο προσδιορισμός και η ταξινόμηση των υποπεριοχών αυτών, βασίστηκαν σε κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, με διάφορα ανάλογα υποστρώματος και σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης σε αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. (*Raines, 1998*).

Βρέθηκαν λοιπόν έξι διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης του υποστρώματος. Οι P_0 , P_1 , P_2 , B_1 , B_2 , B_3 , P_{-1} .

Ο πυρήνας του καταλυτικού κέντρου, αποτελείται από τις υποπεριοχές B_1 , P_1 , B_2 . Οι B_1 και B_2 υποπεριοχές είναι θέσεις πρόσδεσης των νουκλεοτιδίων, ενώ οι P_1 , P_2 , P_0 υποπεριοχές, είναι θέσεις πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, η P_1 υποπεριοχή η οποία όπως προαναφέραμε είναι συντηρημένη με την αντίστοιχη P_1 της ριβονουκλεάσης *A*, προσδένει τη φωσφορική ομάδα μετά τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Περιέχει τρία κρίσιμα κατάλοιπα 15His, 38Lys, 129His. Η P_2 υποπεριοχή αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3'θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου όπου είναι συνδεδεμένο στη B_2 περιοχή. Περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 10Trp και 7Trp. Η P_0 περιοχή αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη B_1 περιοχή. Η B_1 υποπεριοχή στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι συντηρημένη με τη B_1 υποπεριοχή της ριβονουκλεάσης *A*. Τα κατάλοιπα αμινοξέων της B_1 υποπεριοχής είναι: Thr42, Leu130, His82, Ile133.

Η υποπεριοχή B₂ στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μερικώς συντηρημένη με την αντίστοιχη της ριβονουκλεάσης A και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων Asp71 και Glu111 . ενώ οι υποπεριοχές P₀ και P₂ διαφέρουν αρκετά ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. (Εικόνα 7). Η P₋₁ είναι μια νέα υποπεριοχή που ταυτοποιήθηκε μόνο στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και δεν υπάρχει στις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες η οποία προσδένει θεϊικά ανιόντα (SO₄). Περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Arg36, Asn39, και Gln40(Mosimann *et al.*, 1996) . Πρόσφατα, μάλιστα βρέθηκε ότι η υποπεριοχή P₋₁ είναι κρίσιμη για τη δραστικότητα ριβονουκλεάσης της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης (Sikriwal *et al.*, 2009)

Επίσης δε θα έπρεπε να παραληφθεί ότι οι υποπεριοχές B₁ και B₂ στη ριβονουκλεάση A, καθώς και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη προτιμούν να προσδένουν πυριμιδίνες και πουρίνες αντίστοιχα. Όμως, για την EDN έχει βρεθεί ότι με πολυνουκλεοτιδικά υποστρώματα, το ένζυμο έχει 20 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για κυτιδίνες συγκριτικά με τις ουριδίνες στην περιοχή B₁ και 100 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενοσίνες στην περιοχή B₂ (Sorrentino, S *et al.*, 1998).



Εικόνα 7: Απεικονίζονται οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος στην EDN και RNaseA. Η περιοχή 5'-N-p...p-N-3' είναι το RNA υπόστρωμα. Τα κατάλοιπα που έχουν υπογραμμιστεί ανήκουν στην EDN. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση κοπής του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

1.5 Ενζυμική Αναστολή

Η δραστικότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μορίων ή ιόντων που ονομάζονται αναστολείς. Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής των ενζύμων. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης.

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη-αντιστρεπτή. Ένας μη-αντιστρεπτός αναστολέας προσδένεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία.

Ένας τέτοιος αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο. Ο αντιστρεπτός αναστολέας, αντιθέτως μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον της αντίδρασης σχετικά εύκολα, και όταν αφαιρεθεί το ένζυμο επανακτά τη δραστικότητά του. Έτσι αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως περιγράφεται στη σχέση 1.

$E+I \rightleftharpoons EI$ (1) όπου I ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα.

Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση 2:

$$K_i = [EI]/[E][I] \quad (2).$$

Ενώ η σταθερά Michaelis K_m αποτελεί μέτρο της αγχιστείας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά K_i είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου με τον αναστολέα.

Η αντιστρεπτή αναστολή μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις τύπους ενζυμικής αναστολής:

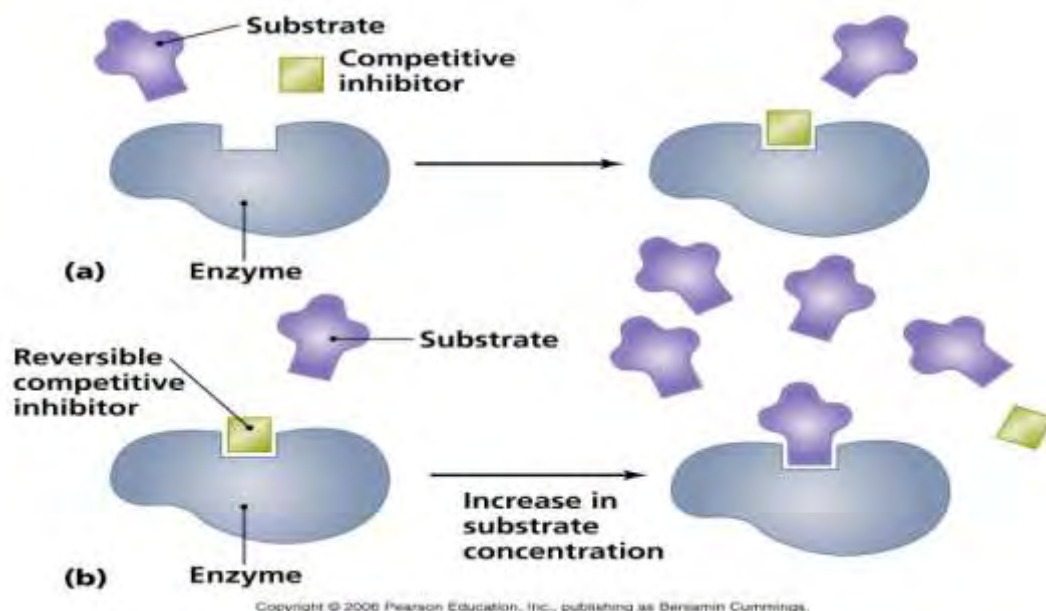
Α)Συναγωνιστική Αναστολή:

Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδένει υπόστρωμα, σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES, ή αναστολέα, σχηματίζοντας το σύμπλοκο EI, αλλά όχι και τα δύο (ESI). Το υπόστρωμα συναγωνίζεται με τον αναστολέα για την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο. Ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδμένα σε ένα υπόστρωμα. **(Εικόνα 8)** Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει στη μέγιστη τιμή της (V_{max}), διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος, η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Μετά από κινητικές μελέτες, παρατηρούμε λοιπόν ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα.

Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M , που καλείται K_M^{app} είναι αριθμητικά ίση με

$$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_i),$$

όπου $[I]$ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου - αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_M^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.

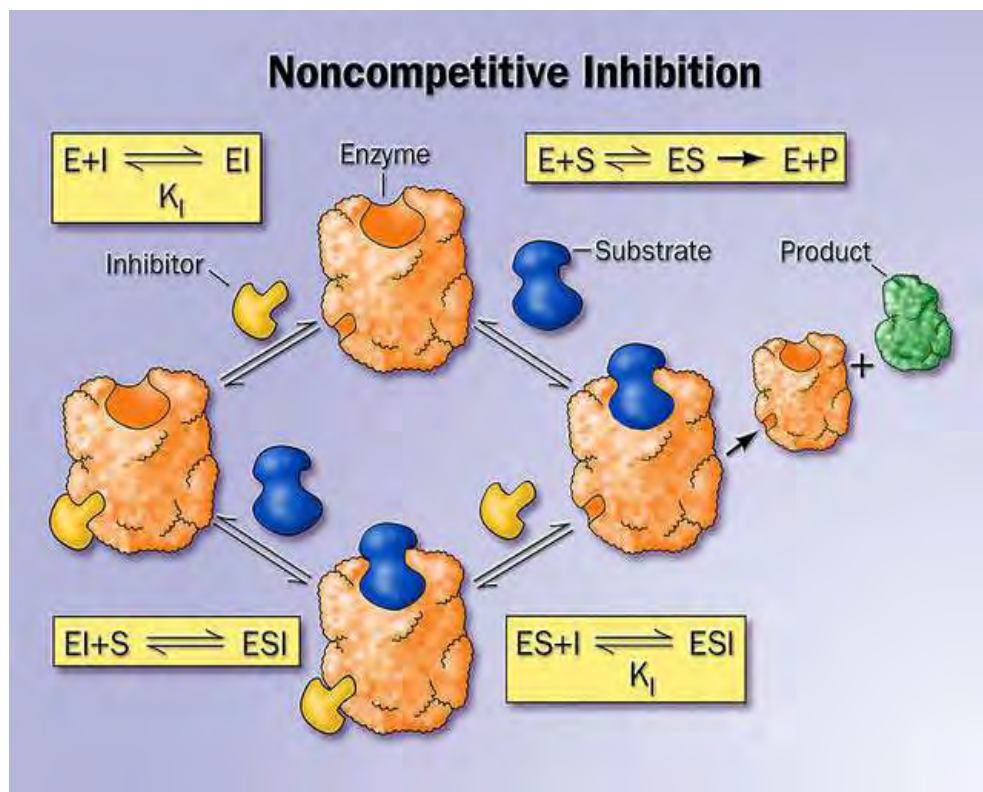


Εικόνα 8: Συναγωνιστική αναστολή. Το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για τη θέση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο. Η αναστολή μπορεί να αποφευχθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

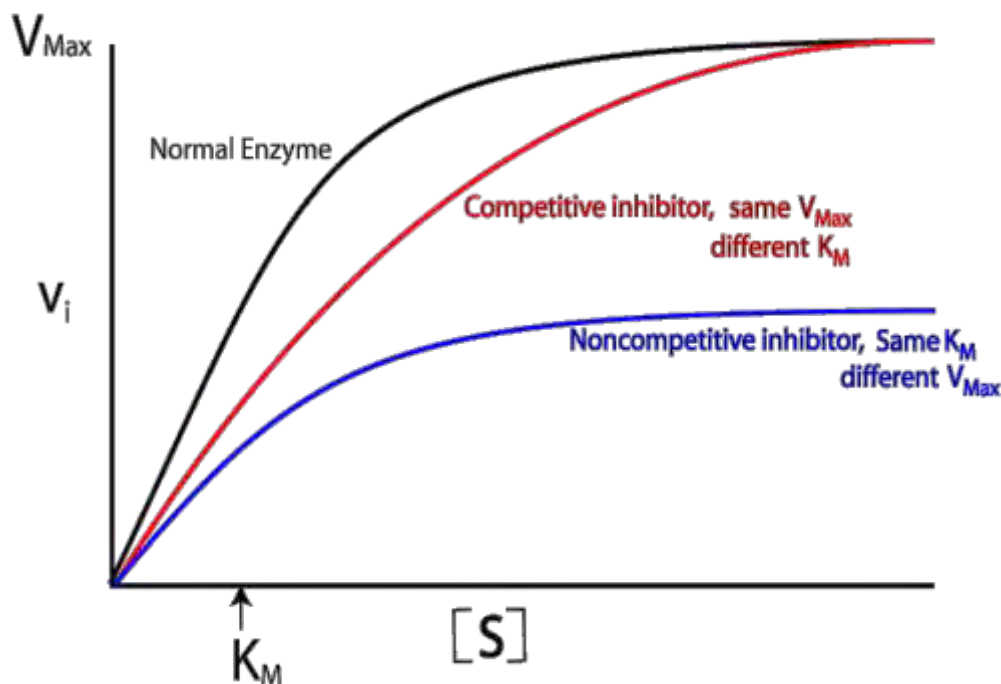
Β) Μη-συναγωνιστική αναστολή:

Ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα στο ένζυμο αλλά σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Ένα σύμπλοκο όμως ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος (ESI) δεν μπορεί να παράγει προϊόν. Η μη-συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με η συναγωνιστική αναστολή δε μπορεί να ξεπεραστεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. (Εικόνα 9) Συνεπώς η ταχύτητα δε μπορεί να φτάσει σε μέγιστη τιμή v_{max} ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Είναι φανερό λοιπόν ότι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου θα ελαττωθεί, μιας και το ουσιαστικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αναστολέα-ενζύμου θα είναι η αφαίρεση μορίων ενζύμου από το σύστημα. Έτσι συνάμα ελαττώνεται και η τιμή της v_{max} σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M .

Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου.



Εικόνα 9: Μη-συναγωνιστική αναστολή: Ο αναστολέας και το υπόστρωμα προσδένονται ταυτόχρονα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η μη-συναγωνιστική αναστολή δε μπορεί να αποφευχθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Εικόνα 10: Διάγραμμα που απεικονίζει την κινητική συναγωνιστικού αναστολέα, μη-συναγωνιστικού αναστολέα, και χωρίς αναστολέα.

Γ) Μικτή αναστολή:

Στους αναστολείς μικτού τύπου μεταβάλλονται τόσο η k_m όσο και η v_{max} . Η k_m μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η v_{max} πάντα θα ελαττώνεται.

Δ) Ανταγωνιστική αναστολή:

Στις προηγούμενες τρεις περιπτώσεις αναστολής, οι αναστολείς μπορούν να δεσμεύονται απευθείας με το ένζυμο. Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και αυτό συνεπάγεται μείωση των τιμών τόσο της K_m , όσο και της V_{max} .

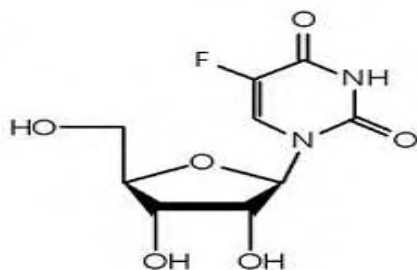
Αναστολείς

Πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A, προκαλούν αρκετά παθολογικά προβλήματα στον οργανισμό. Για παράδειγμα, η αγγειογενίνη που σχετίζεται με την νεοαγγειογένεση στον καρκίνο και σε άλλες ασθένειες, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, και η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη που όπως προαναφέραμε εμπλέκονται στη φλεγμονή και σε άλλες ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να αποτελέσουν στόχους φαρμάκων (αναστολείς) που καταστέλλουν την «παθολογική» δράση τους.

Πραγματοποιήθηκαν πολλές κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλοι αναστολείς της RNase A. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζει 36% ομολογία με την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ενώ το κεντρικό καταλυτικό της κέντρο (P1) είναι απόλυτα συντηρημένο με αυτό της RNase A. Επιπροσθέτως, τα περιφερειακά κέντρα σύνδεσης B1 και B2 είναι επίσης σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα. Έτσι λοιπόν ορισμένοι από τους αναστολείς της RNase A, οι οποίοι καλύπτουν υποπεριοχές με συντηρημένα αμινοξέα και στα δυο ένζυμα, δοκιμάστηκαν και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.

Πρόσφατα έχουν μελετηθεί στην παγκρεατική ριβονουκλεάση A, μια σειρά νουκλεοζιτών, (η δράση των οποίων θα αναφερθεί παρακάτω), οι οποίοι παρουσίασαν μια πολύ ισχυρή αναστολή με σταθερές αναστολής της τάξης των μM . Οι νουκλεοζίτες αυτοί αποτελούνται από βάσεις πυριμιδίνης, είναι απαλλαγμένοι από φωσφορικές ομάδες, και κάποιοι από αυτούς διαθέτουν ένα τριαζολικό δακτύλιο ο οποίος αυξάνει κατά πολύ την αναστολή. (Parmenopoulou et al. 2012)

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας δε. **(Εικόνα 11)**. Ο αναστολέας αυτός είναι νουκλεοσίδιο ουρακίλης, δε διαθέτει τριαζολικό δακτύλιο και έχει ως υποκαταστάτη το φθόριο. Η σταθερά αναστολής του στη ριβονουκλεάση Α είναι $33.6 \pm 2.6 \mu\text{M}$. (Parmenopoulou *et al.* 2012). Έτσι λοιπόν επειδή όπως αναφέρθηκε το ενεργό κέντρο των ριβονουκλεασών είναι υψηλά συντηρημένο, δοκιμάστηκε και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.



Εικόνα 11: Ο αναστολέας 11VP006

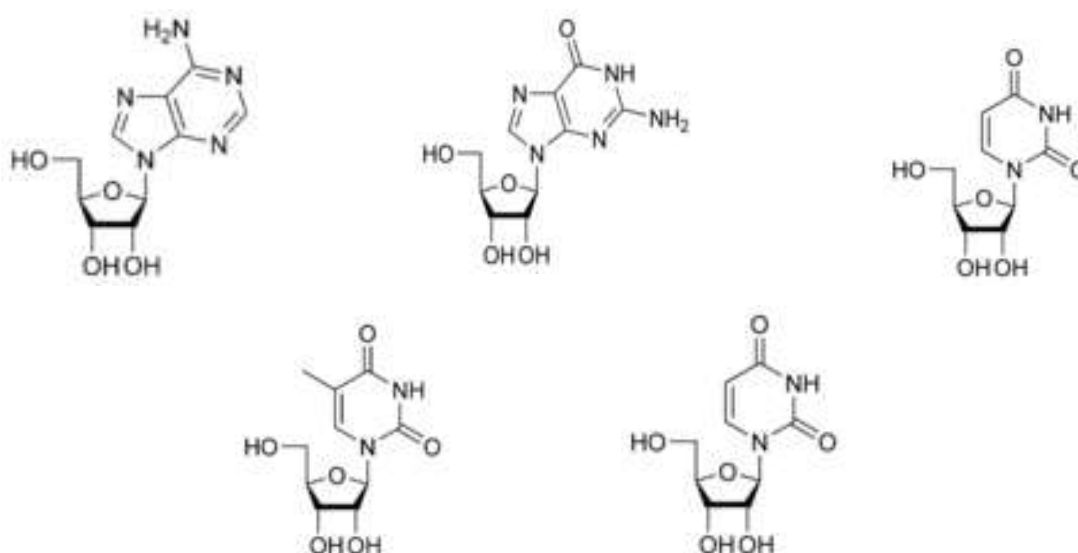
1.6 Νουκλεοζίτες

Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β -N-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης συνηθίζεται σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου.

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης, διότι η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου.

Φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών από ειδικές κινάσες του κυττάρου τους μετατρέπει σε νουκλεοτίδια, τα οποία είναι οι μοριακοί δομικοί λίθοι του DNA και του RNA.

Μερικά παραδείγματα νουκλεοζιτών φαίνονται στην **Εικόνα 12**.



Εικόνα 12: Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη)

Μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών, όπως είναι γνωστό, πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα .

Τα αντικαρκινικά και τα αντιϊικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιϊκού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι ιϊκές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιϊκό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιϊκών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντιϊκά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιϊκό γονιδίου από τις ιϊκές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιϊκού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιϊκών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα. εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους.

Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιϊκή θεραπεία .

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ευκές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή . Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες,. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιϊκές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία ως στόχος τέθηκε αρχικά η έκφραση και ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης από κύτταρα *E. Coli*. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της RNase A και ως ριβονουκλεάση, μετά από κρυσταλλογραφικές μελέτες, βρέθηκε ότι παρουσιάζει πολλές δομικές ομοιότητες με τη παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A). Όσον αφορά τη RNase A, έχει μελετηθεί μια σειρά συνθετικών νουκλεοζιτών, οι οποίοι παρουσίαζαν μια αρκετά ικανοποιητική συναγωνιστική αναστολή της τάξης των μM (micromolar). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι τιμές της σταθεράς διάστασης K_i ήταν χαμηλότερες (επομένως ήταν ισχυρότερη η αναστολή) όταν ο αναστολέας είχε στο μόριο του τριαζολικό δακτύλιο, σε σχέση πάντα με τους αναστολείς που μελετήθηκαν και δεν είχαν στο μόριο τους τριαζολικό δακτύλιο. (Parmenopoulou *et al.*, 2012) Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της σύνδεσης του αναστολέα 6e στην EDN. Ο αναστολέας αυτός, μέσω κρυσταλλογραφίας, έχει αποδειχθεί πως προσδένεται στο ενεργό κέντρο της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, προκαλώντας σημαντική αναστολή της δράσης της. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στη δομή του αναστολέα και σε ένα άτομο φθορίου που είναι ο υποκαταστάτης. Γνωρίζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολή της EDN από τον αναστολέα αυτόν. Απώτερος σκοπός αποτελεί ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βελτιωμένων αναστολέων του ενζύμου μικρού μοριακού βάρους η οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η EDN.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ (EDN)

1. Πλασμιδιακοί φορείς και επαγωγή της έκφρασης της EDN

1.1 Βακτηριακά στελέχη E.coli

Για την έκφραση της EDN χρησιμοποιήθηκαν στελέχη E.coli.

Γενικότερα, τα πλασμίδια είναι από τους πιο κατάλληλους φορείς ανασυνδιασμένου DNA λόγω του μικρού τους μεγέθους.

Επίσης, τα περισσότερα πλασμίδια διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά, στα οποία πλεονεκτούν σε σχέση με άλλους φορείς κλωνοποίησης. Αυτά είναι:

- Θέση έναρξης της αντιγραφής (oriC)
- Γονίδια δείκτες (Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για την επιλογή ανασυνδιασμένων κλώνων)
- Περιοχή πολυσυνδέτη (περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή εξωγενούς DNA, η οποία περιέχει θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες).
- Περιοχή υποκινητή (P), χειριστή (O) και καταστολέα (I).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο p ET11 c φορέας της εταιρίας Novagen για την κλωνοποίηση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

Ο φορέας αυτός αποτελείται από ένα γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα *lac*, τον T7 υποκινητή που είναι αποκλειστικά ειδικός για την T7 RNA πολυμεράση (μη-βακτηριακή) και η οποία δεν εντοπίζεται στο βακτηριακό γονιδίωμα, τον χειριστή *lac* που μπορεί να εμποδίζει τη μεταγραφή, την περιοχή πολυσυνδέτη, τον παράγοντα *f1* (origin of replication) και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη

Τα βακτήρια *E.coli* είναι αρνητικοί κατά Gram βάκιλλοι και παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά την έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Μερικά απ'αυτά είναι ο οικονομικός εργαστηριακός εξοπλισμός και η ευκολία στην καλλιέργειά τους, όπως και η δυνατότητα τροποποίησης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος B834 με το εξής γονιδίωμα:

$F^{-}omp\ T\ hsdS_B(r_b^{-}m_b^{-})\ gal\ dcm\ met\ (DE3)\ p\ LysS\ (cam^R)$

1.2 Καλλιέργεια *E.coli*

Με τον όρο καλλιέργειες κυττάρων εννοούμε την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών κυττάρων σε συγκεκριμένες συνθήκες. Συνήθως ενδιαφέρει η ανάπτυξη καλλιέργειών ενός μόνο τύπου κυττάρου, δηλαδή η ανάπτυξη ομοιογενών καλλιέργειών που δεν περιέχουν άλλα κύτταρα εκτός από αυτά που μας ενδιαφέρουν.

Τέτοιες καλλιέργειες ονομάζονται αξενικές και για την ανάπτυξή τους απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες. Αυτό προϋποθέτει πως ο χώρος εργασίας, καθώς και όλα τα σκεύη και υλικά να είναι αποστειρωμένα (χρησιμοποιείται λύχνος Bunsen και όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο).

Στις εργαστηριακές καλλιέργειες μας ενδιαφέρει η εκθετική φάση (φάση που τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται μεταβολικώς ενεργά), για την παραγωγή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία για την *E. coli* αντιστοιχεί σε $OD=0,6-0,8$. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια γίνεται με φασματοφωτομέτρηση στα 600 nm, όπου μετριέται σε ειδική κυψελίδα η οπτική πυκνότητα 1 ml καλλιέργειας. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37°C.

1.2.1 Θρεπτικά υλικά

Για τη δημιουργία μικρών καλλιεργειών:

- Προετοιμασία θρεπτικού υλικού LB (Lysogeny Broth)
 - Για την παρασκευή 200 ml LB και γνωρίζοντας πως για 1 L καλλιέργειας απαιτούνται 25g LB, ζυγίζουμε 5g LB.
 - Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος.
 - Το LB αποστειρώνεται και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Για τη δημιουργία μεγάλων καλλιεργειών:

- Προετοιμασία θρεπτικού υλικού TB (Terrific Broth)
 - Παρασκευάζεται Διάλυμα 1, 900ml, το οποίο αποτελείται από 12g Tryptone και 24g yeast extract. Στο τέλος τοποθετούμε 4ml γλυκερόλη.

- Παρασκευάζεται Διάλυμα 2, 100ml, το οποίο αποτελείται από 12,54g K_2HPO_4 και 2,31g KH_2PO_4 .
- Αναμιγνύεται το Διάλυμα 1 με το Διάλυμα 2 μέχρι τον τελικό όγκο (1L)
- Σε δύο κωνικές φιάλες του 1L προσθέτω από 500ml του ΤΒ θρεπτικού που παρασκευάστηκε.
- Ακολουθεί αποστείρωση των δύο κωνικών φιαλών και φύλαξη στο ψυγείο.

1.2.2 Αντιβιοτικά

Άλλη μέθοδος αποφυγής επιμολύνσεων αλλά και ο πιο διαδεδομένος τρόπος επιλογής μετασχηματισμένων βακτηρίων είναι η προσθήκη αντιβιοτικών στις καλλιέργειες.

Έτσι εξασφαλίζεται η ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, καθώς η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προσδίδεται συνήθως με την ύπαρξη κατάλληλων γονιδίων στο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε.

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε κατηγορίες βάσει του τρόπου με τον οποίον δρουν και οι οποίοι είναι:

- Παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- Καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη
- Παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση
- Παρεμποδίζουν τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (Amp). Ανήκει στην κατηγορία των β-λακταμών και δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Η στρατηγική που ακολουθούν τα ανθεκτικά στελέχη για την επιβίωση τους είναι η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού μέσω της παραγωγής του ενζύμου β-λακταμάση, η οποία εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο και καταλύει την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου της αμπικιλλίνης. Το γονίδιο bla που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση βρίσκεται στα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, και έτσι μετά από ένα μετασχηματισμό σε τρυβλίο που περιέχει απρ επιβιώνουν μόνο τα στελέχη που περιέχουν τα πλασμίδια αυτά.

1.2.3 Διαδικασία ανάπτυξης μικρών υγρών καλλιιεργειών.

- Σε δύο αποστειρωμένα φάλλον προστίθενται από 5ml θρεπτικού LB, καθώς και 20ml απρ (αρχική συγκέντρωση 100 mg/ml, τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml σε τελικό όγκο 5ml)
- Εμβολιασμός από stock κυττάρων E.coli (με ετερόλογο φορέα ενσωματωμένο).
- Επώαση στους 37°C για περίπου 16 h υπό ήπια ανάδευση.

1.2.4 Διαδικασία ανάπτυξης μεγάλων υγρών καλλιιεργειών.

- Εμβολιασμός των δύο αποστειρωμένων κωνικών φιαλών που περιέχουν το θρεπτικό TB με 5ml μικρής καλλιέργειας στην κάθε μία. Επίσης προσθήκη 500 ml απρ στην κάθε μία.
- Επώαση των μεγάλων υγρών καλλιιεργειών στους 37°C υπό 210 rpm για περίπου 7 h.
- Μετά από 7 h, η φωτομέτρηση πήρε την επιθυμητή τιμή, καθώς τα βακτήρια βρισκόταν στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους.
- OD₆₀₀=0,6

$$OD_{600}=0,742$$

Υπενθυμίζεται ότι χρησιμοποιούνται στείρες συνθήκες. Ο πάγκος εργασίας καθαρίζεται σχολαστικά με αιθανόλη, και χρησιμοποιείται αυτόκαυστο καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

1.2.5 Επαγωγή της έκφρασης της EDN

Στην παραγωγή της EDN χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας η ένωση IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης) διότι εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη, και επιπλέον μιας και δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή.

- Προσθήκη επαγωγέα IPTG 1 mM στις κωνικές φιάλες με τις μεγάλες υγρές καλλιέργειες.
- Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C
- Μετά από 4h πήραμε την επιθυμητή οπτική απορρόφηση: $OD_{600}=1,1$.

2. Συλλογή και λύση των κυττάρων

2.1 Συλλογή των κυττάρων

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντησης μαζί με το θρεπτικό υλικό., ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Η EDN είναι μια ενδοκυτταρική μη-διαλυτή πρωτεΐνη και έτσι, μετά το τέλος της επαγωγής, συλλέγεται στο κυτταρικό ίζημα. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν φυγοκέντρωση στους 4°C, 5000rpm για 20min προκειμένου να καθιζάνουν τα κύτταρα. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται αποθηκεύεται στους -20°C.

Σημειώνεται ότι το υπερκείμενο θα πρέπει να είναι διαυγές, διότι αυτό αποτελεί ένδειξη ότι έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα. Αν δεν είναι διαυγές, η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται.

2.2 Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδος και αν δεν πραγματοποιηθεί σωστά μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο μηχανικός τρόπος με τη βοήθεια υπερήχων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Προετοιμασία διαλύματος **Lysis Buffer** που αποτελείται από το **Διάλυμα Α** και το **Διάλυμα Β**.

➤ **Διάλυμα Α** (100ml, pH=8)

PMSF: 1mM

EDTA: 2mM

Triton X-100: 0,1% w/v

Tris-HCl: 10mM

➤ **Διάλυμα Β (10ml)**

Sodium deoxycholate: 4% w/v

Ο PMSF είναι ένας αναστολέας πρωτεασών, και τον χρησιμοποιούμε για αποφυγή τυχόν πρωτεόλυσης. Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που δεσμεύει ιόντα απαραίτητα για τη δράση των πρωτεασών. Στη συνέχεια, το Triton X-100 είναι απορρυπαντικό και το χρησιμοποιούμε για τη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης. Τέλος το Tris-HCl είναι ρυθμιστικό διάλυμα και διατηρεί το pH στην κατάλληλη τιμή. Το Sodium deoxycholate διαταράσσει και αποτρέπει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Για να πραγματοποιηθεί καλύτερα η λύση των κυττάρων προσθέτουμε επικουρικά λυσοζύμη (40mg) και βενζονάση (2μl).

- Διαλυτοποίηση του ιζήματος της φυγοκέντρησης (pellet) με το Διάλυμα Α και με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου.
- Προσθήκη 1 ml του διαλύματος Β στα φάλκον με το διαλυτοποιημένο ίζημα και παραμονή για 15 min υπό ανάδευση στους 4°C.

Οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται σε πάγο.

- Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων(sonicator). Με ήπιες περιστροφικές κινήσεις, πραγματοποιούνται συνολικά πέντε κύκλοι υπερήχων(30 sec υπέρηχοι, 30 sec χωρίς υπέρηχους, δυο φορές, ένας κύκλος)

Η διαδικασία της διάσπασης των κυττάρων πραγματοποιείται απαραίτητα σε πάγο, διότι από την υπερθέρμανση που προκαλείται από τους υπέρηχους μπορεί να προκληθεί πρωτεόλυση. Επίσης, απαραίτητη προϋπόθεση, είναι η διαδικασία να πραγματοποιηθεί στον απαγωγό με κλειστό τζάμι διότι μπορεί να προκαλέσει τύφλωση ή και κώφωση.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αφρός στην επιφάνεια του διαλύματος μετά τη χρήση υπερήχων αποτελεί ένδειξη διάσπασης των κυττάρων.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C για 1h σε 10000 rpm, και συλλογή του ιζήματος.

3. Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση

- Προετοιμασία elution buffer 400ml, p H=8
 - EDTA: 2mM
 - Tris-HCl: 50mM
 - NaCl: 0,3M
- Διαχωρίζουμε το διάλυμα πλύσης (400 ml) σε δύο επιμέρους διαλύματα των 200 ml. Στο ένα διάλυμα προστίθεται Triton 0,1% v/v ενώ στο άλλο διάλυμα δεν προστίθεται Triton.
- Προσθήκη 50 ml του διαλύματος πλύσης με Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.
 - 1^η Ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση για 1h, 4°C, και 9800g.

- Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με διάλυμα πλύσης με Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.
- 2^η Ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση για 1h, 4^οC και 9800g.
- Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με το διάλυμα πλύσης χωρίς Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.
- 3^η Ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση για 1h, 4^οC και 9800 g.
- Αποθήκευση ιζήματος στους -20^οC.

Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ομογενοποιητή. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται σε πάγο και να μη ξεπερνά τα 5-6 min. Επίσης, το ίζημα πρέπει να αποκτήσει μια κρεμώδη υφή, που μαρτυρά ότι τα inclusion bodies διασπάστηκαν πλήρως.

4. Εγκλεισμός της πρωτεΐνης (incubation)

- Πραγματοποιείται πλύση του ιζήματος για 4^η φορά, με 100 ml του διαλύματος πλύσης που δεν περιέχει Triton και φυγοκέντρηση για 1h, 4^οC, 9800g.
- Προετοιμασία του διαλύματος εγκλεισμού(15ml, p H=8,5)
 - 6M Guanidine Hydrochloride
 - 0,1 M Tris
 - 80 m M reduced GSH
 - 2m M EDTA

- Το κυτταρικό ίζημα που συλλέξαμε επαναδιαλύεται με το διάλυμα εγκλεισμού και πραγματοποιείται ομογενοποίηση.
- Ακολουθεί 2h ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στους 25⁰C για 25 min και 18500 rpm.
- Λήψη του υπερκείμενου που αποτελείται από τις πρωτεΐνες των inclusion bodies.

5. Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης

Η μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης πραγματοποιείται είτε με φωτομέτρηση στο UV είτε με τη μέθοδο Bradford. Εδώ ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1mg πρωτεΐνης.

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA με την απορρόφηση τους στα 595 nm. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Bradford παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων κατά την ποσοτικοποίηση Bradford

	BSA mg/ml	BSA stock (10mg/ml)	Buffer EDN	Bradford
	Blank		20 μ l	980 μ l
1	0,2mg/ml	0,4 μ l	19,6 μ l	980 μ l
2	0,4 mg/ml	0,8 μ l	19,2 μ l	980 μ l
3	0,6 mg/ml	1,2 μ l	18,8 μ l	980 μ l
4	0,8 mg/ml	1,6 μ l	18,4 μ l	980 μ l
5	1 mg/ml	2 μ l	18 μ l	980 μ l
6	1,2 mg/ml	2,4 μ l	17,6 μ l	980 μ l

Για τον ποσοτικό προσδιορισμού δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης αναμιγνύουμε 980 μ l του αντιδραστηρίου Bradford με 20 μ l πρωτεΐνης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10 mg πρωτεΐνης. Το δείγμα 7 ήταν το δείγμα της πρωτεΐνης μας. Στο δείγμα αυτό υπήρχαν τα εξής: 15 μ l Buffer, 5 μ l EDN και 980 μ l αντιδραστηρίου Bradford. Όπως γίνεται κατανοητό, η αραιώση του συγκεκριμένου δείγματος ήταν 3:1.

Η αραιώση αυτή έγινε καθώς το δείγμα ήταν ιδιαίτερα πυκνό και σε μικρότερη αραιώση η τιμή της οπτικής απορρόφησης θα ήταν εκτός των ορίων των οπτικών απορροφήσεων των διαλυμάτων που αναγράφονται στον πίνακα.

Με βάση την εξίσωση που προέκυψε από τις OD_{595} , βρέθηκε ότι η ποσότητα της EDN που βρίσκονταν μέσα στο διάλυμα ήταν 4,5mg/ml.

Μετά από επώαση 25 λεπτών στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, λαμβάνεται απορρόφηση στα 595 nm.

6. Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)

Ο υπολογισμός του τελικού όγκου του διαλύματος της αναδίπλωσης που χρησιμοποιούμε, υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που έχουμε (από Bradford), ώστε τελικά η συγκέντρωσή της να μειωθεί και να φτάσει σε 0.15 mg/ml.

Έτσι έχουμε $4,5\text{mg/ml} \times 15\text{ml} = 0,15\text{mg} \times V_2 \Leftrightarrow V_2 = 420\text{ml}$

Άρα, $420\text{ml} - 14\text{ml EDN}$ στο δ/μα εγκλεισμού = 406ml refolding buffer

- Προετοιμασία του διαλύματος αναδίπλωσης (refolding buffer) 420ml, pH 8.5
 - 0,1 M Tris-acetate
 - 0,5M L-arginine
 - 0,69 mM GSSG (oxidized GSH)

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSSG γίνεται με τον τύπο $GSH/GSSG = 4/1$.

- Η πρωτεΐνη τοποθετείται σε προχοΐδα έτσι ώστε να πέφτει σταγόνα-σταγόνα στα 406 ml refolding buffer.
- Η διαδικασία της αναδίπλωσης πραγματοποιήθηκε στους 4°C και διήρκησε 48-72 h.

7. Συμπύκνωση πρωτεΐνης

Μετά από το πέρας της αναδίπλωσης, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH στο 5 και ακολουθείται φυγοκέντρηση στους 4°C, 30min, 16000g ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές σ' αυτό το pH.

Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται στους 4°C με τη βοήθεια κασέτας Millipore-Pellicon XC-Device.

Το buffer που διαπερνάει την κασέτα είναι πάντα αυτό μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη. Άρα στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιείται εκ νέου παρασκευή του refolding buffer.

Αφού γίνεται εξισορρόπηση με refolding buffer (200ml) ακολουθεί το δείγμα πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που είναι μεγαλύτερες από 10kD «παγιδεύονται» στην κασέτα. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης η πρωτεΐνη διατηρείται στους 4°C.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος της συμπύκνωσης (2L, pH=5), το οποίο περιέχει 0,15M Sodium Acetate.

Έπειτα, τοποθετούμε την πρωτεΐνη σε μεμβράνες διαπίδυσης, και έπειτα σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης και πραγματοποιείται η διαδικασία της διαπίδυσης.

Η διαδικασία της κασέτας πραγματοποιήθηκε συνολικά δύο φορές.

8. Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το φορτίο γίνεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε $pH=7$ είναι θετικό, τότε θα δεσμευτεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δε θα δεσμευτεί στη στήλη αυτή. Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εκλουστούν πρώτες, ακολουθούμενες από αυτές με υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων.

Η EDN είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, και επομένως για τον διαχωρισμό της χρησιμοποιήθηκε κατιονική στήλη, και συγκεκριμένα η Mono S-Resource S με χωρητικότητα 1ml. Η μέγιστη πίεση που μπορεί να ασκηθεί στη στήλη αυτή είναι 1,5MPa.

Η χρωματογραφία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία $4^{\circ}C$, και ο απαραίτητος εξοπλισμός περιλαμβάνει αντλία για τη ρύθμιση της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων στη στήλη και συσκευή συλλογής κλασμάτων.

Ως διαλύματα έκλουσης παρασκευάστηκαν τα εξής:

- Buffer A ($V=1L$, $pH=5$)

➤ Sodium Acetate: 0,15M

- Buffer B (V=1L, p H=5)

➤ Sodium Acetate: 0,15M

➤ NaCl: 2M

Τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα με αποστειρωμένα φίλτρα στο UV και απαρωμένα.

Αρχικά, η πρωτεΐνη φορτώνεται στη superloop, και πραγματοποιείται εξισορρόπηση της στήλης με Buffer A το οποίο περνάει απ'όλο το σύστημα, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης. Για μια εξισορρόπηση απαιτούνται πέντε όγκοι στήλης.

Έπειτα περνά δείγμα πρωτεϊνών με ροή 1ml/min. Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται στο διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό επιτεύχθηκε με τη βοήθεια της διαπίδυσης που πραγματοποιήθηκε μετά τη συμπύκνωση. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες που δε διαθέτουν το κατάλληλο φορτίο διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη. Τέλος πραγματοποιείται έκλουση της EDN από τη στήλη με τη βοήθεια του Buffer B. Είναι γνωστό ότι η συλλογή της πρωτεΐνης μας γίνεται στο 20% του Buffer B. Το άλας συνδέεται με τα bids στο υλικό της στήλης και έτσι αποδεσμεύει τις πρωτεΐνες.

Με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος λοιπόν, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ της πρόσδεσης τους σε αυτή.

Αρχικά λοιπόν θα εκλουστούν οι ασθενώς προσδεδεμένες πρωτεΐνες , ενώ οι ισχυρά προσδεδεμένες πρωτεΐνες θα ληφθούν στα τελευταία κλάσματα με τη μέγιστη συγκέντρωση άλατος.

Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm.

Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

Η EDN περνά από τη στήλη **2 φορές**.

Η στήλη πλένεται με διάλυμα (100ml) που περιέχει 20% αιθανόλη, και 0,2M sodium acetate.

9. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE.

Η μετακίνηση ενός μορίου με καθαρό φορτίο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ονομάζεται ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σχεδόν πάντα σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί σα μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, ανάλογα με το μοριακό βάρος και φορτίο τους.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου με το μετά νατρίου άλας του θειϊκού δωδεκυλίου(SDS) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καθαρότητας διαφόρων παρασκευασμάτων, το χαρακτηρισμό των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο και σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών και ιονικής ισχύος.

Το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα αντιδρά καταρχάς με περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης και SDS. Κάτω απ'αυτές τις συνθήκες οι γέφυρες -S-S- που υπάρχουν στις πρωτεΐνες ανάγονται και το SDS ενώνεται με τις πρωτεΐνες δημιουργώντας ανιονικά σύμπλοκα, καταστρέφοντας σχεδόν όλες τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Οι ανιονικές αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, διαχωρίζονται στη συνέχεια ηλεκτροφορετικά σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου σε περιβάλλον που περιέχει SDS. Το SDS δίδει σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου της πρωτεΐνης προς τη μάζα της πρωτεΐνης και με βάση το λόγο αυτού και το μέγεθος των πόρων των πηκτών κινούνται και διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες.

Συνεπώς η κινητικότητα των πολυπετιδικών αλυσίδων της πρωτεΐνης είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους. Οι μικρές πρωτεΐνες δηλαδή μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος. Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-Page ανακαλύφθηκε από τον Laemmli το 1979. Πρόκειται για μια μη-συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής που αποτελείται από δύο πηκτές.

Αρχικά την πηκτή διαχωρισμού (running gel) όπου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μείγματος πρωτεϊνών, και στη συνέχεια την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο Ρh από την πηκτή διαχωρισμού και συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε στενές ζώνες.

Μετά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 µg πρωτεΐνης ανά ταινία. Εναλλακτικά η χρώση μπορεί να γίνει με βαφή αργύρου όπου με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,02 µg πρωτεΐνης ανά ταινία.

- Παρασκευή πηκτής

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 15%. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβαξης φαίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβαξης

Πηκτή διαχωρισμού (10ml) 15%		Πηκτή επιστοίβαξης (5ml) 5%	
H ₂ O	2,3 ml	H ₂ O	3,4 ml
30% acrylamid mix	5ml	30% acrylamid mix	0,83ml
1,5M Tris-HCl p H=8.8	2,5 ml	1,5M Tris-HCl p H=6.8	0,63ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,05 ml
10% APS	130µl	10% APS	70 µl
TEMED	7 µl	TEMED	8µl

Το APS (υπερθειϊκό αμμώνιο) παρέχει ελεύθερες ρίζες στον καταλύτη TEMED (N,N,N,'N'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη) που καταλύει το σχηματισμό τους.

Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂ αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής. Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος ακριβώς πριν να μεταφερθούν τα διαλύματα εντός των πλακών ώστε να μην αρχίσει ο πολυμερισμός πολύ νωρίς. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και μεταφέρεται στο χώρο μεταξύ των πλακών γεμίζοντας το 75% του χώρου. Η πηκτή καλύπτεται με ισοπροπανόλη για προστασία της πηκτής από το οξυγόνο. Η ισοπροπανόλη αφαιρείται όταν ο πολυμερισμός έχει τελειώσει και οι δυο φάσεις έχουν διαχωριστεί. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και διαβιβάζεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σχηματίζοντας μια στοιβάδα πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, μέχρι την επιφάνεια. Αμέσως τοποθετείται κατάλληλο πλαστικό χτενάκι για το σχηματισμό καθορισμένου αριθμού πηγαδιών. Οι πηκτές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου μέχρι να πολυμεριστούν πλήρως.

- Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν ως εξής: Σε κάθε erppendorf τοποθετήθηκαν 25μl του υπό εξέταση δείγματος και 5μl loading buffer (με σύσταση 250mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % w/v SDS, 0,5 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 500mM μερκαπτοαιθανόλη, 50 % v/v γλυκερόλη).

Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται γιατί αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος ώστε να παραμείνει στο πηγαδάκι και η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης βάφει το δείγμα ώστε να διακρίνεται το μέτωπο του δείγματος στη πηκτή. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 95 °C και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά 13 000 rpm.

Πριν την ηλεκτροφόρηση αφαιρείται το χτενάκι και συναρμολογείτε η συσκευή ηλεκτροφόρησης (οι πλάκες με τις πηκτές τοποθετούνται κατακόρυφα).

Στη συσκευή τοποθετείται στη συνέχεια ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS, pH 8,3- SDS Running Buffer) έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 110V.

- Χρώση της πηκτής

Η χρώση της πηκτής έγινε με silver staining για λόγους ευαισθησίας και ακρίβειας. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

1. 50% μεθανόλη 50ml
2. Fixation 150ml
0,0775g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε 150ml ddH₂O
3. AgNO_3 250ml
0,25g AgNO_3 σε 250ml ddH₂O

Προσοχή: Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο. Μετά την παρασκευή του φυλάσσεται στο σκοτάδι.

4. Developer 250ml

5g Na_2CO_3 σε 250ml ddH₂O.

Πριν τη ρίψη στο gel προστίθενται στο διάλυμα αυτό 100ml φορμαλδεΐδης.

5. Stopper 250ml

12,5μl οξικό οξύ σε 250ml ddH₂O.

Η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- i) Το stacking αφαιρείται με τη βοήθεια σπάτουλας και τοποθετήθηκε το Fixation Buffer (150ml) για 20min.
- ii) Αφαίρεση Fixation Buffer και προσθήκη methanol 50% για 10min.
- iii) Αφαίρεση methanol 50% και προσθήκη ddH₂O είτε O/N ή πραγματοποιούνται 5/6 πλύσεις διάρκειας 10min η κάθε μία.
- iv) Αφαίρεση ddH₂O και προσθήκη sensitive buffer ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) για 20-30sec.
- v) Αφαίρεση sensitive buffer και ξέπλυμα δύο φορές με ddH₂O (1min/πλύση).
- vi) Προσθήκη AgNO_3 για 20min.
- vii) Αφαίρεση AgNO_3 και προσθήκη developer buffer. Ήπια ανακίνηση του gel μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες (~6-7min).
- viii) Αφαίρεση developer και προσθήκη stopper.

10. Εισαγωγή κρυσταλλώσεων

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι αυτή της διάχυσης ατμών, και εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές με τις τεχνικές της α)κρεμάμενης σταγόνας, β)της καθήμενης σταγόνας και γ)της σταγόνας sandwich.

Για τη δημιουργία κρυστάλλων το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant), το οποίο είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Επειδή η συγκέντρωση των ιόντων άλατος είναι μεγαλύτερη στο καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάμου κρυστάλλωσης από το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στην επιφάνεια, μόρια διαλύτη θα κινηθούν από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προς το δοχείο με διάχυση ατμών στην αέρια φάση.

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας η διαλυτότητα της πρωτεΐνης στη σταγόνα ελαττώνεται. Το διάλυμα της πρωτεΐνης στη σταγόνα τελικά γίνεται υπερκορεσμένο, μια κατάσταση που είναι θερμοδυναμικά ασταθής.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μέρος της πρωτεΐνης στη σταγόνα είτε να σχηματίσει κρυσταλλικούς πυρήνες που τελικά θα μεγαλώσουν για να γίνουν μεγάλοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης.

Η μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν αυτή της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop). Η τεχνική περιγράφεται ως εξής: Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μl από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700- 1000 μl) διαλύματος καταβυθιστικού (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (**Εικόνα 13**).

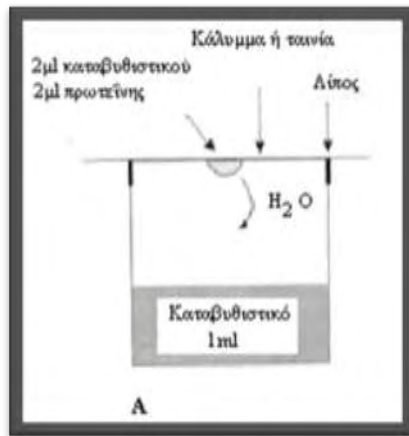
Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού να είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα και αυτό για ένα κλειστό σύστημα σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλ. τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή ωςότου η τάση ατμών της σταγόνας και της δεξαμενής να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού όμως έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.

Για να κρυσταλλωθεί η EDN, αρχικά συμπυκνώθηκε μέχρι η τελική της συγκέντρωση να είναι 8,74 mg/ml. Να σημειωθεί ότι, προκειμένου να δημιουργηθούν κρύσταλλοι, πρέπει η συγκέντρωση της EDN να είναι τουλάχιστον 3,5mg/ml.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κρυστάλλωσης το οποίο αποτελούνταν από:

- ✓ 0,1M Sodium Cacodylate/HCl pH 6,5
- ✓ 1,5M Sodium Acetate

Στο ρεζερβουάρ κάθε πλακιδίου κρυστάλλωσης τοποθετούνται 700 μ L από το παραπάνω διάλυμα, και στη συνέχεια στην καλυπτρίδα αναμιγνύονται 1.5 μ L από το διάλυμα του ρεζερβουάρ με 1.5 μ L από το διάλυμα της EDN. Οι καλυπτρίδες εφαρμόζονται και σφραγίζονται πάνω από τα ρεζερβουάρ του πλακιδίου. Μετά το πέρας 7-10ημερών γίνεται ορατό αν έχουν σχηματιστεί ή όχι κρύσταλλοι.



Εικόνα 13: Η μέθοδος διάχυσης ατμών στην τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας.

2^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ

Περιγραφή της μεθόδου

Η δραστικότητα της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε ακολουθώντας μια μέθοδο κατακρήμνισης με υποστρώμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Anfinsen et al. (Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954). Η αποικοδόμηση του RNA από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη πραγματοποιείται όπως ακριβώς και στη ριβονουκλεάση A, σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφο-ρυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιαμέσου.

Η ταχύτητα της τρανσφωσφορυλίωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν της υδρόλυσης και ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης ενώ το κυκλικό ενδιάμεσο εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιαμέσου

Πειραματική διαδικασία

1. Προσδιορισμός ειδικής δραστικότητας της EDN

Η ειδική δραστικότητα ή καθαρότητα (specific activity) ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος ανά 1 λεπτό κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Οι μονάδες της ειδικής δραστικότητας είναι $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$. Η ειδική δραστικότητα εκφράζει όχι μόνο τη δραστικότητα αλλά και την ποσότητα του εξεταζόμενου ενζύμου.

2. Υπολογισμός συγκέντρωσης της EDN.

Η συγκέντρωση της EDN προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 280nm με τη βοήθεια της σχέσης των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times b \times c,$$

όπου A : η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης,
 ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης (για την EDN είναι γνωστό ότι $\epsilon=1,64$),
 b : το πάχος της κυψελίδας,
 c : συγκέντρωση εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

3. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υποστρώμα (tRNA) και περιέχει τα έξης αντιδραστήρια: 0,05 M NaH_2PO_4 με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι : 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM και 6 μM . Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μl , ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η EDN έχει αραιωθεί με MilliQ H_2O , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 60 nM.

Η αντίδραση σταματά μετά από 5min αναμινύοντας 300 μl από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μl διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 5 min αφού έχει προστεθεί η EDN, σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 13.200 στροφές (rpm) για 17 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 560μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται.

Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Τέλος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Graft. Παρακάτω δίνεται ο Πίνακας 3 με τις σχετικές ποσότητες των διαλυμάτων που κατασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m .

Πίνακας3: Δείγματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις t RNA για την εύρεση της K_m της EDN

10nM EDN	t=5min	k_m	T=30°C		
tRNA conc.	2μM	3μM	4μM	5μM	6μM
reaction buffer	150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
tRNA(60μM)	10μl	15μl	20μl	25μl	30μl
EDN (60nM)	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
d H ₂ O	90μl	85μl	80μl	75μl	70μl
stop buffer	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl

4. Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA.

Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι η 3μM. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με αυτή για τον προσδιορισμό της K_m με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα εκχυλίσματος διαφορετικής συγκέντρωσης.

Η *ειδική δραστικότητα* (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστικότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα μg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης του tRNA. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστικότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστικότητας κατά 50%.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε τις εξής συγκεντρώσεις αναστολέα: 10 μM , 15 μM , 40 μM και 50 μM .

Ο αναστολέας 6e βρίσκεται σε συγκέντρωση 10m M και αραιώνοντας με DEPC H₂O φτιάχνουμε τα επιθυμητά stock ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 10μM, 15μM 40μ M και 50 μM και να χρησιμοποιούνται στην αντίδραση 30μl. Οι ποσότητες για κάθε διαφορετική συγκέντρωση αναστολέων φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

10nM EDN	t=5min	DRUG conc. 50μM			T=30°C	p H=7,4
		T	A			
† RNA conc.		0μM	2μM	3μM	4μM	5μM
Reaction Buffer		150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
† RNA (60μM)		0μl	10μl	15μl	20μl	25μl
6e (750μM)		20μl	20μl	20μl	20μl	20μl
EDN (60nM)		0μl	50μl	50μl	50μl	50μl
dH ₂ O		130μl	70μl	65μl	60μl	55μl
Stop Buffer		300μl	300μl	300μl	300μl	300μl

10nM EDN	t=5min	DRUG conc. 40μM			T=30°C	p H=7,4
		T	A			
† RNA conc.		0μM	2μM	3μM	4μM	5μM
Reaction Buffer		150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
† RNA (60μM)		0μl	10μl	15μl	20μl	25μl
6e (200μM)		60μl	60μl	60μl	60μl	60μl
EDN (60nM)		0μl	50μl	50μl	50μl	50μl
dH ₂ O		90μl	30μl	25μl	20μl	15μl
Stop Buffer		300μl	300μl	300μl	300μl	300μl

10nM EDN	t=5min	DRUG conc. 15μM			T=30°C	p H=7,4
		T	A			
† RNA conc.		0μM	2μM	3μM	4μM	5μM
Reaction Buffer		150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
† RNA (60μM)		0μl	10μl	15μl	20μl	25μl
6e (225μM)		20μl	20μl	20μl	20μl	20μl
EDN (60nM)		0μl	50μl	50μl	50μl	50μl
dH ₂ O		130μl	70μl	65μl	60μl	55μl
Stop Buffer		300μl	300μl	300μl	300μl	300μl

10nM EDN	t=5min	DRUG conc. 10μM			T=30°C	p H=7,4
	T	A				
† RNA conc.	0μM	2μM	3μM	4μM	5μM	6μM
Reaction Buffer	150μl	150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
† RNA (60μM)	0μl	10μl	15μl	20μl	25μl	30μl
6e (100μM)	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl
EDN (60nM)	0μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
dH ₂ O	120μl	60μl	55μl	50μl	45μl	40μl
Stop Buffer	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl	300μl

5.Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό km και IC₅₀

Υπολογισμός K_m

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν (2, 3, 4, 5, 6 μM). Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Grafit (GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (ν, καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

$$v(s^{-1}) = \frac{\text{Slope} (min^{-1}cm^{-1})}{\varepsilon (M^{-1}cm^{-1})60(sec)[EDN](M)}$$

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας,
ε: συντελεστής απορρόφησης,
λ: μήκος κύματος (278 nm) ,
[EDN] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της K_m και της V_{max} . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις (σ^2) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών K_m και V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Το πρόγραμμα GRAFIT χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της K_m και V_{max} της EDN.

Οι τιμές των K_m των ενζύμων ποικίλουν. Για τα περισσότερα ένζυμα, η K_m έχει τιμές μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} Μ. Η τιμή K_m για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η K_m έχει την εξής έννοια: είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα.

Υπολογισμός IC₅₀

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Εφ' όσων η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\text{Sp. activity} = (\text{OD-Blank}) / 516,4 * 0,00000001 * 300 \text{ } \mu\text{moles CMP} / \text{min} * M \text{ ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,00000001: τα M του ενζύμου στην αντίδραση

300: 5min * 60 sec

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC₅₀, οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{S.a.}_{\text{control}} - \text{S.a.}_i}{\text{S.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου: $\text{S.a.}_{\text{control}}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

S.a._i : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή IC_{50} υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

όπου: s : η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος y μειώνεται όσο η x αυξάνει.

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**.

Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Εν συνεχεία, γίνεται μετατροπή της τιμής IC_{50} σε K_i σύμφωνα με τον τύπο:

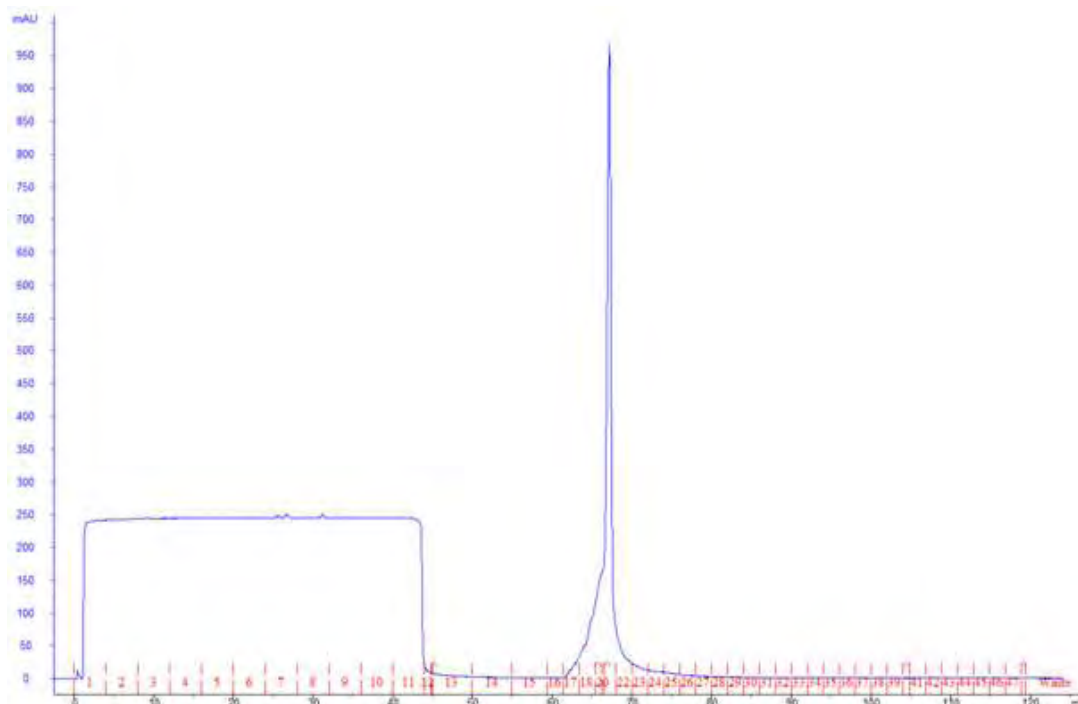
$$K_i = \frac{IC_{50}}{(S / K_m + 1)}$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

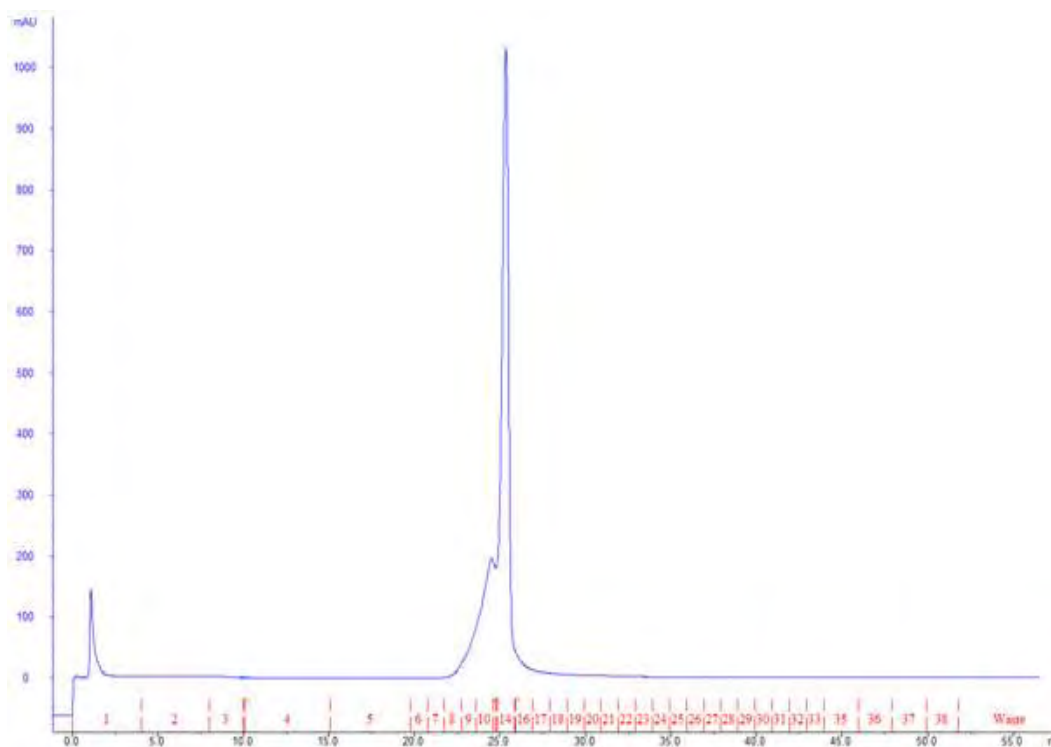
1. Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN

Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη συμπύκνωση, φορτώθηκε σε στήλη Resource S εξισορροπημένη στο ρυθμιστικό διάλυμα 0,15M Sodium acetate, pH= 5 με ροή 1ml/min και ακολούθησε έκπλυση της στήλης με το ίδιο διάλυμα μέχρι μη ανιχνεύσιμης απορρόφησης στα 280 nm. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια εκλούστηκε από τη στήλη με διαβίβαση ρυθμιστικού διαλύματος Sodium acetate 0,15M, pH= 5 με συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM. Συλλέχθηκαν 3 κλάσματα (19, 20, 21) του 1ml, τα οποία εμφάνισαν το peak (**Εικόνα 14**). Οι απορροφήσεις στα 280nm έδειξαν ότι η ποσότητα πρωτεΐνης ήταν περίπου στα 0,89mg/ml.

Έπειτα, ακολουθεί και δεύτερη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Το peak εμφανίστηκε στα κλάσματα 9, και 10 (**Εικόνα 15**) και η απορρόφηση στα 280nm έδειξε, ποσότητα πρωτεΐνης 0,5mg/ml.

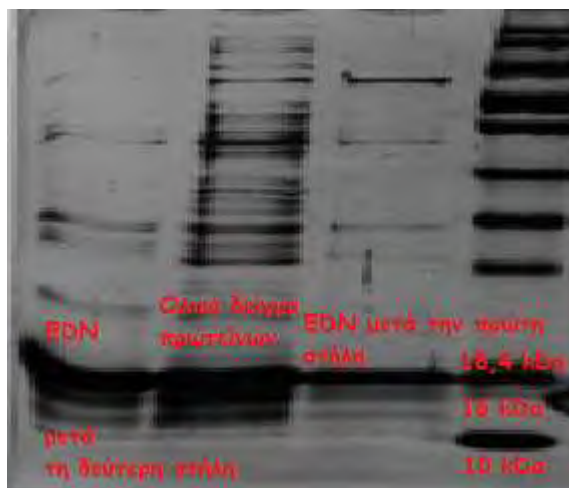


Εικόνα 14: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.



Εικόνα 15: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S για 2^η φορά. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

Μετά την πραγματοποίηση των 2 χρωματογραφιών κατιονοανταλλαγής, πραγματοποιήσαμε την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS, το αποτέλεσμα της οποίας απεικονίζεται ακριβώς παρακάτω.

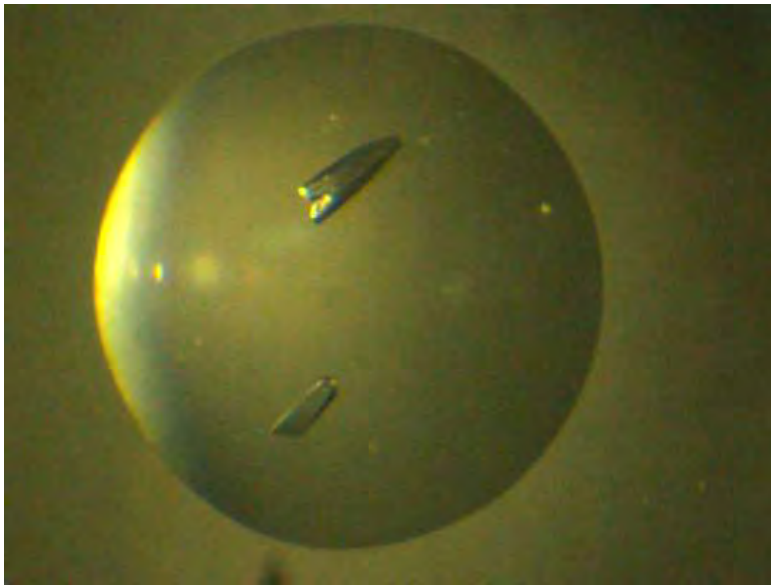


Παρατηρούμε ότι το MB της EDN είναι ίσο με 18,4kDa

2. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

Η καθαρή EDN που προέκυψε μετά τον καθαρισμό ήταν 0,437mg/ml. Στη συνέχεια, η καθαρή ηωσινόφιλη νευροτοξίνη συμπυκνώθηκε στα 8,74mg/ml προκειμένου να προχωρήσουμε στη διαδικασία των κρυσταλλώσεων.

Κρύσταλλοι της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας μέσω της διαδικασίας που αναφέρθηκε στο πειραματικό κομμάτι. Οι πρώτοι κρύσταλλοι εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες στους 16°C. Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν δίνονται στην **Εικόνα 16**.

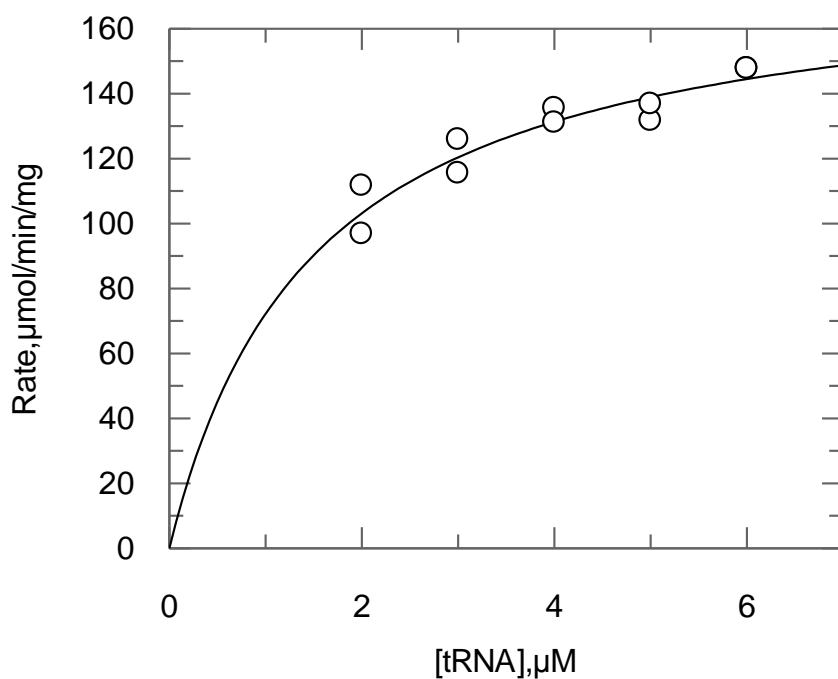


Εικόνα 16: Κρύσταλλος της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

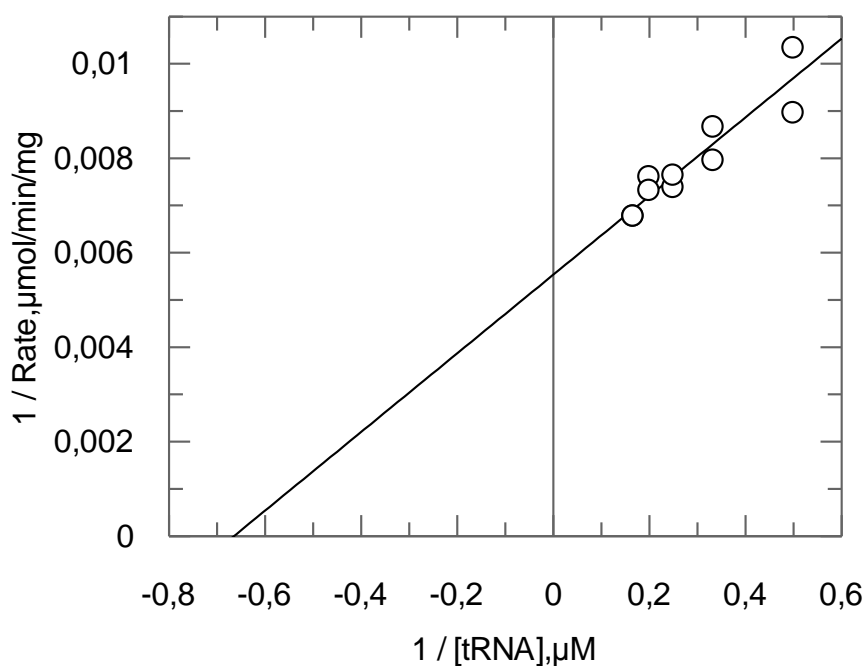
3. ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Υπολογισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η πρωτεΐνη που παράχθηκε χρησιμοποιήθηκε για το προσδιορισμό της K_m και V_{max} του ενζύμου (πειραματική διαδικασία) σε pH 7,4 και θερμοκρασία 30 °C. Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι: 0 μM, 2 μM, 3 μM 4 μM 5 μM και 6 μM ενώ η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στην ενότητα **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**.



Διάγραμμα 1: Κινητική μελέτη της EDN σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος t RNA (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μM). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



Διάγραμμα 2: Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

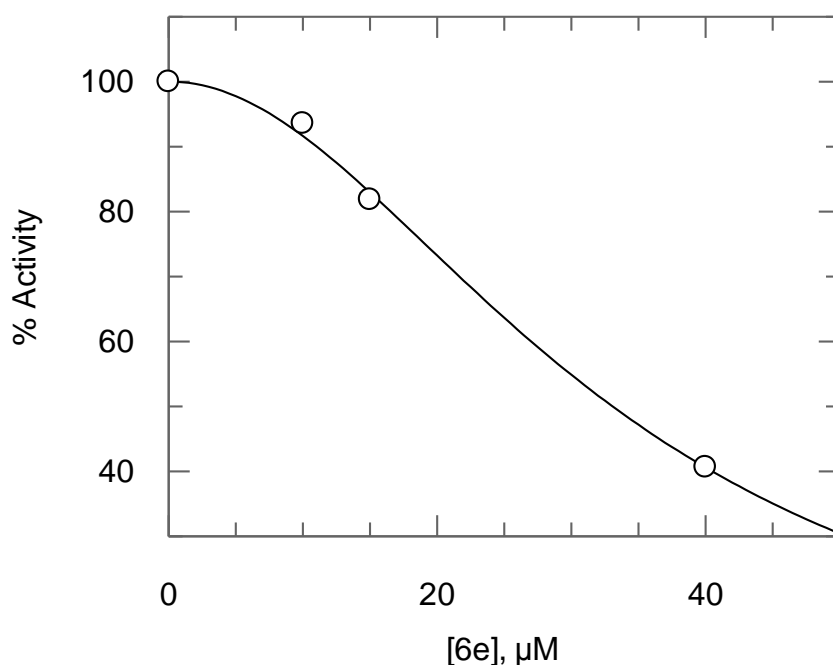
Από το διάγραμμα 2, προκύπτει ότι:

$$K_m = 1,50 \pm 0,28 \mu\text{M} \text{ και } V_{\max} = 180,7 \pm 10,46 \mu\text{mol CMP/mg/min.}$$

Κινητική ανάλυση της 5-φθορο-ουριδίνης στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της EDN από το συνθετικό νουκλεοσίδιο β-D-ριβοφουρανόζυλο-5-φθορο-ουρακίλη (6e) πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η τιμή της IC_{50} (Διάγραμμα 3) βρέθηκε ίση με $IC_{50} = 33.07 \pm 0.5 \mu M$. Ο υπολογισμός της IC_{50} του 6e αναστολέα έγινε μέσω του προγράμματος Grafit, ενώ η μετατροπή της τιμής της IC_{50} σε K_i πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα EUREKA και βρέθηκε να είναι $K_i = 11,04 \pm 2,22 \mu M$



Διάγραμμα 3: : Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα (6e)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην εισαγωγή, εκκρίνεται από τα κοκκία των ηωσινόφιλων κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της νευροτοξικής της δράση και της εμπλοκής της σε αλλεργικές παθήσεις και φλεγμονές που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα.

Είναι απαραίτητη λοιπόν, αρχικά η απομόνωση της σε καθαρή μορφή, όπως πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία μέσω έκφρασής της με τη βοήθεια ενός ετερόλογου βακτηριδιακού φορέα *Escherichia Coli*, και μέσω στήλης χρωματογραφίας ιοντοαλλαγής. Επίσης, ο σχεδιασμός μορίων με ανασταλτική δράση, που θα μπορούσαν να περιορίσουν τις παθολογίες που προκαλεί η EDN σε υπερηωσινοφιλικά σύνδρομα. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, είναι μια ριβονουκλεάση η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RNase A). Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και η ριβονουκλεάση A, παρουσιάζουν 36% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, καθώς και 46% ομοιότητα.

Τα χαρακτηριστικά της EDN, μετά από κινητικές μελέτες βρέθηκαν ότι είναι $K_m=1,50 \pm 0.28 \mu M$ και $V_{max}=180,7 \pm 10.46 \mu mol \text{ CMP/mg/min}$.

Η RNase A, είναι μια καλά μελετημένη ριβονουκλεάση και το καταλυτικό της κέντρο είναι συντηρημένο την πλειονότητα των ριβονουκλεασών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για τη μελέτη ομόλογων πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας $\delta\epsilon$, ο οποίος δοκιμάστηκε αρχικά στην RNase A. Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για να προσδιοριστεί η ικανότητα αναστολής του στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη. Εντοπίστηκε λοιπόν ανασταλτική δράση της τάξης των μM , και συγκεκριμένα με τιμή $K_i = 11,04 \pm 2,22 \mu\text{M}$. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο αναστολέας $\delta\epsilon$ χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη RNase A και παρουσίασε αναστολή με τιμή $K_i = 33,58 \mu\text{M}$. Παρατηρούμε ότι η πρόσδεση και η ανασταλτική δράση του $\delta\epsilon$, είναι σημαντικά πιο αποτελεσματική στην EDN. Αυτό οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι καλύπτει υποπεριοχές της, οι οποίες δεν είναι συντηρημένες με τη RNase A όπως P_2 , P_0 , P_{-1} .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Boix E, Nikolovski Z, Moiseyev GP, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogués MV(1999). Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. J Biol Chem. 1999 May 28;274(22):15605-14.

Bulpitt KJ, Verity MA, Clements PJ, Paulus HE. (1990). Association of L-tryptophan and an illness resembling eosinophilic fasciitis. Clinical and histopathologic findings in four patients with eosinophilia-myalgia syndrome. Arthritis Rheum. 1990 Jul;33(7):918-29. Department of Medicine, University of California, Los Angeles School of Medicine.

Chusid MJ, Dale DC, West BC, Wolff SM (1975). The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. Medicine (Baltimore). 1975 Jan;54(1):1-27. Review.

Durack DT, Sumi SM, Klebanoff SJ (1979). Neurotoxicity of human eosinophils. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Mar;76(3):1443-7

Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ(1981). Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Aug;78(8):5165-9.

Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ (1986). Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 May;83(10):3146-50.

Hamann, K. J., Barker, R. L., Ten, R. M., and Gleich, G. J. (1991). The molecular biology of eosinophil granule proteins. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 94, 202-209

- Hertzman PA, Blevins WL, Mayer J, Greenfield B, Ting M, Gleich GJ (1990). Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. *N Engl J Med*. 1990 Mar 29;322(13):869-73.
- Kaufman LD, Gruber BL, Gregersen PK, (1991). Clinical follow-up and immunogenetic studies of 32 patients with eosinophilia-myalgia syndrome. *Lancet*. 1991 May 4;337(8749):1071-4.
- Martin RW, Duffy J, Engel AG, Lie JT, Bowles CA, Moyer TP, Gleich GJ, (1990). The clinical spectrum of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with L-tryptophan ingestion. Clinical features in 20 patients and aspects of pathophysiology. *Ann Intern Med*. 1990 Jul 15;113(2):124-34.
- Mosimann SC, Newton DL, Youle RJ, James MN, (1996). X-ray crystallographic structure of recombinant eosinophil-derived neurotoxin at 1.83 Å resolution. *J Mol Biol*. 1996 Jul 26;260(4):540-52. Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Moussaoui M, Noques V, Guash A, Barman T, Travers F, Cuchillo CM (1998). The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with Cytidine 2',3'-cyclic phosphate, vol.273, No.40, pp25565-25572.
- Ng SC, Lee MK, Teh A, (1989). Acute organic brain syndrome due to drug-induced eosinophilia. Department of Pathology, Medical Faculty, University of Malaya, Kuala Lumpur. *Postgrad Med J*. 1989 Nov;65(769):843-4.
- Parmenopoulou V, Chatzileontiadou DS, Manta S, Bougiatioti S, Maragozidis P, Gkaragkouni DN, Kaffesaki E, Kantsadi AL, Skamnaki VT, Zographos SE, Zounpoulakis P, Balatsos NA, Komiotis D, Leonidas DD (2012) :Triazole pyrimidine nucleosides as inhibitors of Ribonuclease A. Synthesis, biochemical, and structural evaluation *Bioorg Med Chem*. 2012 Dec 15;20(24):7184-93.
- Rosenberg H.F. (1998). Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. *Biotechniques*. 1998 Feb;24(2):188-90, 192.
- Rosenberg H.F and Joseph B. Domachowske (2001). Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 70, November 2001
- Rosenberg H.F. (2008). RNase A Ribonucleases and Host Defense: an Evolving Story. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008, May;83(5):1079-1087

Rosenberg H.F. (2008). Eosinophil-derived Neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008, June; 9(3):135-140

Roubenoff R, Coté T, Watson R, Levin ML, Hochberg MC (1990). Eosinophilia-myalgia syndrome due to L-tryptophan ingestion. Report of four cases and review of the Maryland experience. *Arthritis Rheum.* 1990 Jul;33(7):930-8.

Sedgwick JB, Vrtis RF, Jansen KJ, Kita H, Bartemes K, Busse WW (2004). Peripheral blood eosinophils from patients with allergic asthma contain increased intracellular eosinophil-derived neurotoxin. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:568-574.

Sikriwal Deepa, Divya Seth and Janendra K.Batra (2009). Role of catalytic and non-catalytic subsite residues in ribonuclease activity of human eosinophil-derived neurotoxin. *Biol. Chem.*, Vol390, pp.225-234, March, 2009.

Sikriwal Deepa, Divya Seth, Shama Parveen, Anu Malik, Shobha Broor, and Janendra K. Batra (2012). An Insertion in Loop L7 of Human Eosinophil-Derived Neurotoxin Is Crucial for its Antiviral Activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 113:3104-3112 (2012)

Silver RM, Heyes MP, Maize JC, Quearry B, Vionnet-Fuasset M, Sternberg EM (1990). Scleroderma, fasciitis, and eosinophilia associated with the ingestion of tryptophan. *N Engl J Med.* 1990 Mar 29;322(13):874-81.

Sorrentino S. (1998). Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54,785-794.

Stryer, L., Berg, J.M., and Tymoczko, J.L. 2002. *Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman, pp. 1050.

Swaminathan GJ, Holloway DE, Veluraja K, Acharya KR (2002). Atomic resolution (0.98 Å) structure of eosinophil-derived neurotoxin. *Biochemistry.* 2002 Mar 12;41(10):3341

Tolander LM, Bamford CR, Yoshino MT, Downing S, Bryan G (1991). Neurologic complications of the tryptophan-associated eosinophilia-myalgia syndrome. *Arch Neurol.* 1991 Apr;48(4):436-8.

